

GIOVANNA ASSIS RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR EMBRIONÁRIO EM TUMOR DE
CÓRTEX ADRENAL DE CRIANÇAS**

**CURITIBA
2004**

GIOVANNA ASSIS RODRIGUES

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADOR EMBRIONÁRIO EM TUMOR DE
CÓRTEX ADRENAL DE CRIANÇAS**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná**

Orientador: Prof. Dr. Bonald C. de Figueiredo

**CURITIBA
2004**

*A Deus, pela oportunidade da vida.
Ao meu marido Rodrigo, pela eterna colaboração.
Aos meus pais Sebastião e Marlene pela compreensão.
A minha irmã Izabela pelo apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao Professor Dr. Bonald C. Figueiredo pela orientação e estímulo sempre presentes.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Cid Aimbiré de Moraes Santos pela confiança e pelos auxílios.

Aos meus pais e à Izabela, que sempre souberam compreender e aceitar minha ausência, e ao Rodrigo pela amizade, pelo afeto e pelas colaborações na edição e formatação do texto da dissertação.

Aos colegas do CEGEMPAC Elis, Fernanda, Sohaila e Renato pelos inúmeros auxílios durante toda a pesquisa e do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo carinho e pela amizade.

Ao Professor Luiz Cláudio Fernandes e ao Ricardo K. Yamazaki pela compreensão e pela colaboração, e aos professores Dr. Enzo Lalli e Dr. Hermênio Lima pelas sugestões e pelo aprendizado.

Aos cirurgiões, hematologistas, oncologistas e endocrinologistas pediátricos dos Hospitais Erasto Gaertner e Pequeno Príncipe pela cooperação.

Aos funcionários do setor de revelação de raio-X do Hospital de Clínicas pelo auxílio.

Ao Luca pelo carinho e pela companhia durante a redação da dissertação.

A todos que direta ou indiretamente forneceram algum tipo de contribuição.

“Eu guardo, para todos aqueles que de uma ou outra forma contribuíram para fazer-me mais grata a vida, uma eterna gratidão, e estampo nessa gratidão a lealdade com que conservo essa recordação, que jamais pode palidecer ali, onde se encerra tudo o que constitui a história de minha vida”. Da Sabedoria Logosófica

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	x
LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL	3
2.1.1 Considerações gerais	3
2.1.2 Desenvolvimento do córtex adrenal	5
2.1.3 Etiopatogenia	6
2.1.4 Papel da enzima 17 α -hidroxilase no córtex adrenal	9
2.1.5 Diagnóstico e tratamento	11
2.2 FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA	14
2.2.1 Proteínas ancoradas por GPI	14
2.2.2 Fosfatases alcalinas	15
2.2.3 Fosfatase alcalina placentária	16
2.2.3.1 Características gerais	16
2.2.3.2 Características estruturais	17
2.2.4 O gene PLAP	19
2.2.5 PLAP solúvel não tumoral	22
2.2.6 PLAP como marcador tumoral	24
2.3 CD30	26
2.3.1 Características gerais	26
2.3.2 Expressão e funções	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS	29
4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA	30
2.2.1 Características do método	30
4.2.2 Principais aplicações em oncologia	31
4.2.3 Análise imunohistoquímica em cortes de parafina	32
4.3 PESQUISA DO ALELO R337H <i>Tp53</i>	34
4.2 ANÁLISE DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	36
4.1.1 HISTÓRICO	36
4.2.1 Preparo das amostras	39
4.2.2 Eletroforese	39
4.2.3 <i>Western blotting</i>	40
4.2.3.1 Transferência para a membrana	40

4.2.3.2 Incubação com anticorpos	40
5 RESULTADOS	42
5.1 IMUNOHISTOQUÍMICA	42
5.2 PESQUISA DO ALELO R337H TP53	43
5.3 SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	54
ANEXOS	84
ANEXO 1	85
ANEXO 2	87
ANEXO 3	89

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM TAC	4
TABELA 2 -	DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES DE TAC	4
QUADRO 1 -	PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA IMUNOHISTOQUÍMICA EM DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO	32
TABELA 3 -	RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS	43
TABELA 4 -	RESULTADOS DA IH PARA P53 CONFIRMADOS POR PCR.....	44
QUADRO 2 -	RELAÇÃO PH, TEMPERATURA, ESTRUTURA E ATIVAÇÃO DE P53	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL	6
FIGURA 2 -	BIOSSÍNTESE DE HORMÔNIOS DO CÓRTEX ADRENAL	10
FIGURA 3 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DO MITOTANE.....	13
FIGURA 4 -	MODELO DOS DÍMEROS DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA	18
FIGURA 5 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PLAP E DA FOSFATASE ALCALINA DE <i>Escherichia coli</i>	21
FIGURA 6 -	PADRÕES DE IMUNORREATIVIDADES OBTIDOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA	44
FIGURA 7 -	RESULTADOS POSITIVOS PARA A PESQUISA DE PLAP EM AMOSTRAS DE TAC PELAS TÉCNICAS DE SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	46
FIGURA 8 -	PROPOSTA PARA A ORIGEM EMRIONÁRIA DO TAC.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrófico
<i>ALP-1</i>	-	Gene que codifica PLAP
<i>ALP-2</i>	-	Gene que codifica PLAP-like
C-terminal	-	Carboxi-terminal
DAB	-	Diaminobenzidina
DDD	-	1,1-di-(<i>p</i> -clorofenil)-2,2-dicloroetano
DHEA	-	Deidroepiandrosterona
EBV	-	Epstein-Barr Vírus
EDTA	-	Ácido etilenediaminotetraacético
GPI	-	Glicofosfatidilinositol
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
HRP	-	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTLV	-	Vírus T-linfotrópico humano
Ig	-	Imunoglobulina
IH	-	Imunohistoquímica
<i>o,p'</i> DDD	-	1-(<i>o</i> -clorofenil)1-(<i>p</i> -clorofenil)-2,2-dicloroetano
<i>Tp53</i>	-	Gene p53
PBS	-	Tampão fosfato salina
PCR	-	Reação de polimerase em cadeia
pH	-	Potencial Hidrogeniônico
PLAP	-	Fosfatase alcalina placentária
R337H <i>Tp53</i>	-	Gene p53 mutante com substituição de arginina por histidina
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAC	-	Tumor adrenocortical de crianças
TNFR	-	Receptores do fator de necrose tumoral
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
μm	-	Micrômetro
°C	-	Graus Celsius
11p	-	Braço curto do cromossomo 11
17q	-	Braço longo do cromossomo 17
17q13.1	-	Banda 1, região 3.1 do braço longo do cromossomo 17
337H	-	Histidina no códon 337
9q34	-	Banda 3, região 4 do braço longo do cromossomo 9
bp	-	Pares de base
g	-	Grama
KDa	-	Quilodaltons
L	-	Litro
mA	-	Miliampere
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro
ng	-	Nanograma
p34	-	Braço curto, banda 3, região 4
p36.1	-	Braço curto, banda 3, região 6.1
q34-37	-	Banda 3 regiões 4 e 7, braço longo
v/v	-	Volume por volume

LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

β -mercaptoetanol	-	<i>Sigma</i>
Ácido acético glacial	-	<i>Merck</i>
Acrilamida	-	<i>Gibco BRL</i>
Anticorpo anti-CD 30	-	<i>Dako - M 0751(clone BerH2)</i>
Anticorpo anti-p53	-	<i>Dako - M 7001(clone DO-7)</i>
Anticorpo anti-PLAP (IH)	-	<i>Dako - M 7191 (clone 8A9)</i>
Anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo biotinilado	-	<i>Dako - E 0464</i>
Anticorpo de ovelha anti-IgG coelho biotinilado	-	<i>Dako - E 0432</i>
Anticorpo de ovelha anti-IgG camundongo biotinilado	-	<i>Dako - E 0433</i>
Anticorpos anti-PLAP (<i>western blotting</i>)	-	<i>Biomeda - k111 (clone 8B6)</i> <i>RDI - CBL207c (clone 8B6)</i>
Aparelho de transferência (<i>western blotting</i>)	-	<i>Bio-Rad (Trans-Blot SD - semi-dry)</i>
Persulfato de amônio (APS)	-	<i>Gibco BRL</i>
Azul de bromofenol	-	<i>Baker Analyzed®</i>
<i>Brilliant Blue G</i>	-	<i>Acros</i>
<i>Comassie Blue Brilliant</i>	-	<i>Acros</i>
Cuba de eletroforese vertical (<i>western blotting</i>)	-	<i>Pharmacia Biotech</i>
DAB	-	<i>Sigma</i>
Filtros de papel	-	<i>Bio-Rad</i>
Glicerol	-	<i>Invitrogen™</i>
Glicina	-	<i>Invitrogen™</i>
Inibidor de protease	-	<i>Roche</i>
Kit estreptoavidina-peroxidase	-	<i>Dako – k 0679</i>

Leite em pó desnatado	-	<i>Molico</i>
Marcador de peso molecular	-	<i>Invitrogen™ (MultiMark® Multi-Colored Standard)</i>
Membrana de nitrocelulose	-	<i>Amersham Bioscience (Hybond-C)</i>
Metanol	-	<i>Merck</i>
Microscópio óptico comum	-	<i>Zeiss</i>
N-N'-metilenebisacrilamida	-	<i>Acros</i>
Padrão de PLAP	-	<i>Sigma P3895</i>
Revelador quimioluminescente	-	<i>Pierce (Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate)</i>
SDS	-	<i>Gibco BRL</i>
TEMED	-	<i>Invitrogen™</i>
Tris	-	<i>Invitrogen™</i>
Tween 20	-	<i>Sigma</i>
Vermelho de Ponceau	-	<i>Invitrogen™</i>

RESUMO

Aproximadamente 90% dos tumores adrenocorticais em crianças (TAC) no estado do Paraná apresentam a mutação R337H *Tp53* nas células da linhagem germinativa, um fator de supressão tumoral. Os hormônios sexuais, o cortisol e outros hormônios em excesso nos TACs são os responsáveis pelo aparecimento dos sinais e sintomas mais freqüentes: síndrome virilizante e síndrome de Cushing. A grande maioria dos pacientes com TAC é diagnosticada até os três anos de idade, porém os responsáveis pelas crianças relatam que, normalmente, os sintomas começaram a surgir cerca de seis meses a dois anos antes do diagnóstico. Diante dessas observações e de uma série de diferenças entre tumores de crianças e de adultos, formulou-se a hipótese de que o tumor de crianças poderia surgir durante o período embrionário. O presente trabalho tem como objetivo testar essa hipótese por meio da identificação de um marcador embrionário em amostras de TAC. Para tal foi realizada a pesquisa de, fosfatase alcalina placentária (PLAP) e CD30, referidos como possíveis marcadores embrionários na identificação de tumores de testículos e ovários, os quais apresentam função esteroidogênica a exemplo da adrenal. A técnica de imunohistoquímica (IH) foi utilizada para mostrar PLAP e CD30 em cortes embebidos e parafina, e outras duas proteínas, 17 α -hidroxilase (17-OHase) e *Tp53*, foram utilizadas como controles. A fim de confirmar a presença do(s) marcador(es) que apresentar(em) resultado(s) positivo(s) na técnica de IH e o peso molecular esperado nas amostras de TAC, foi utilizada também a técnica de *western blotting* em amostras congeladas de TAC, empregando como controles positivos, amostra de placenta e PLAP comercial. Os resultados obtidos na IH revelaram que CD30 (apenas 5,1% de positividade nas amostras pesquisadas) não é um marcador específico ou confiável, ao passo que PLAP foi encontrada em 36,2% dos TACs. O percentual baixo de imunopositividade encontrado para 17-OHase e *Tp53* em relação ao esperado (aproximadamente 95% e 90%, respectivamente) pode ser justificado por problemas no preparo das amostras do tumor ou na incubação com os anticorpos. Este motivo pode também sugerir que pode haver um percentual maior de TACs de crianças positivos para PLAP na IH. A presença de PLAP foi confirmada no *western blotting* que revelou também o peso molecular esperado, entre 70 e 75 KDa. Os resultados obtidos para 17-OHase e p53 mostraram as condições do material pesquisado, enquanto os resultados positivos para PLAP são as melhores evidências de que TAC de crianças é de origem embrionária. Entretanto, por ter havido provavelmente baixa sensibilidade para PLAP na IH, o presente trabalho não pode assegurar a existência de TAC negativo para PLAP. Sabe-se que, em algum momento da embriogênese do córtex adrenal, ocorre falha do R337H *Tp53* ou de outros mutantes e formação do TAC, cujo crescimento ocorre a diferentes velocidades. Novas pesquisas com PLAP e outros possíveis marcadores em tecidos de TAC e em soro de pacientes possibilitarão um diagnóstico precoce das recidivas, que está freqüentemente associado a um prognóstico mais favorável.

Palavras-chave: tumor de córtex adrenal, marcador embrionário, fosfatase alcalina placentária.

ABSTRACT

Approximately 97% of the pediatric adrenocortical tumors (ACT) from Paraná present the germline mutation R337H *Tp53*. This allele has been considered to be responsible for the increased incidence of ACT in children from this state in southern Brazil. Sex hormones, cortisol and other hormones produced at high levels in ACT are responsible for the most common clinical presentations: virilizing syndrome and Cushing's syndrome. Most of the patients with ACTs are diagnosed in the first three postnatal years, however, parents have reported onset of signs and symptoms six months to two years earlier. Based upon these observations and on a number of differences between children and adults, a hypothesis has been formulated to propose that most cases of pediatric ACTs are developed during the embryonic period. The present work was proposed to test the embryonic origin of ACT through the identification of an embryonic marker in ACT samples. To address this objective, two candidates were selected: placental alkaline phosphatase (PLAP) and CD30, both reported as possible embryonic markers for identification of testis seminoma and ovary cancer, which present steroidogenic tissue as the adrenal cortex. The immunohistochemistry technique (IHC) was used to investigate the presence of PLAP and CD30 in paraffin-embedded sections, while 17 α -hydroxylase (17-OHase) and p53, were used as controls. In order to confirm the presence of the marker that show a positive result by IH and its molecular weight, another technique, *western blotting* was used to investigate frozen samples of ACT, employing as positive controls placental tissue and commercial PLAP. The IHC findings have revealed that CD30 (only 5,1% of the samples were positive) is not a specific or safe marker, while PLAP was found to be positive in 36,2% of the ACTs. The low frequency of positive cases for 17-OHase and p53 in relation to expected frequencies (approximately 95% and 90%, respectively) may be explained by differences in assay conditions such as sample preparation and antibody incubation. This may be also the reason to suggest that frequency of positive results for PLAP in IH may be probably higher. The presence of PLAP was confirmed in the *western blotting*, which has revealed the expected molecular weight, between 70 and 75 KDa. The obtained results for 17-OHase and p53 have contributed to evaluate the sample conditions, while the PLAP results are the best evidence to date that children's ACT is from embryonic origin. However, due to low IHC sensitivity results for PLAP, this study could not determine, which samples were really negative for PLAP, which would be indicated to test the negative PLAP expression hypothesis in the majority of adult ACTs. This study proposes that at a certain moment of the adrenocortical development there must be a failure of the remaining R337H *Tp53* and/or of other mutants that contribute to develop cancer cells that will form ACT. According to the profile of each ACT, it is expected different growth rates of the tumor, and further studies with PLAP and other candidates will contribute to reach earlier diagnosis of recurrences, which is frequently associated with better prognosis.

Key-words: adrenocortical tumor, embryonic marker, placental alkaline phosphatase.

1 INTRODUÇÃO

O tumor adrenocortical em crianças (TAC) é uma neoplasia rara, cuja frequência anual mundial é de 0,3/milhão de crianças menores de 15 anos de idade (GURNEY *et al.*, 1995). Na região sul do Brasil este número aumenta para 3,4 – 4,2/milhão de crianças (SANDRINI *et al.*, 1997).

O intervalo médio entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico é de cinco meses e aproximadamente 60% dos pacientes são menores de quatro anos. A proporção entre pacientes femininos: masculinos é de 1,7:1 e os sintomas mais freqüentes são síndrome virilizante acompanhada ou não por Síndrome de Cushing. (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004)

O fato dos sinais e sintomas aparecerem, em muitos casos, ainda no primeiro ano de vida, associado às descobertas sobre o intenso remodelamento do córtex adrenal durante o período embrionário (MESIANO; JAFFE, 1997) sugere uma origem pré-natal para o TAC.

As células tumorais expressam algumas proteínas que normalmente são encontradas em outros tecidos ou em outro período da vida. Fosfatase alcalina placentária (PLAP) e CD 30 são dois desses marcadores considerados embrionários. Em condições normais são produzidos em maiores quantidades pelas células sinciciotrofoblásticas durante a gestação e por alguns linfócitos, respectivamente.

Na tentativa de demonstrar a origem embrionária do TAC, foram investigados, pelas técnicas de imunohistoquímica de *western blotting*, esses dois marcadores embrionários em amostras de TAC, uma vez que ambos são descritos na literatura sendo úteis no diagnóstico e/ou monitoramento terapêutico de certos tumores, como os de órgão genitais masculino e feminino, cujo tecido normal possui uma função esteroideogênica como a adrenal.

Observa-se que dentre os exames utilizados para se confirmar o diagnóstico de TAC, não foi descrito ainda um marcador produzido especificamente por essas células tumorais. Dessa forma, vê-se necessário o estudo de algumas proteínas que, potencialmente possam se apresentar como marcadores tumorais, por exemplo, PLAP.

Esta proteína além de indicar a presença do tumor (seminoma, tumor ovariano e provavelmente TAC) por determinação plasmática, poderá ser útil como fator diferencial de outros tipos de tumor de córtex adrenal mais característicos de adultos (MANO *et al.*, 1986).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL

2.1.1 Considerações gerais

O tumor adrenocortical é uma neoplasia das células do córtex adrenal (supra-renal) e apresenta diferenciação histológica e funcional com relação ao tecido de origem (HUTTER *et al.*, 1966).

O primeiro registro de tumor adrenocortical de crianças (TAC) aconteceu em 1864 no hospital Saint George em Londres e foi publicado em 1865 pelo Dr. Pitman na revista Lancet. No Paraná, o primeiro caso de TAC foi relatado em 1934 e, em 1969 surgiram as primeiras evidências da alta incidência dessa patologia em São Paulo (MARIGO *et al.*, 1969).

MICHALKIEWICZ *et al.* (2004) analisaram 254 casos de TAC entre os anos de 1990 e 2001. A grande maioria dos pacientes (79,5%) era da região sul do Brasil; 13,0% dos Estados Unidos e 7.5% de outros países. Deste total de amostras, 228 obtiveram um laudo histológico de carcinoma (tumor maligno) e os 26 restantes, de adenoma (tumor benigno). O intervalo médio entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico foi de cinco meses e a faixa etária era entre 0 a 19 anos. Aproximadamente 60% dos pacientes eram menores de quatro anos e somente 14% tinham mais que 13 anos de idade e a proporção entre pacientes femininos: masculinos era de 1,7:1. Pacientes cujos diagnósticos foram feitos antes dos três anos tendem a serem meninas e no intervalo entre 4 e 12 anos a distribuição sexual do TAC parece ser semelhante. (BERNSTEIN; GURNEY, 1999; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

A apresentação clínica vista em pacientes adolescentes e adultos jovens tende a ser Síndrome de Cushing ou tumores “não-funcionantes”, ao passo que 90% das crianças apresentam características de síndrome virilizante (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Alguns outros dados obtidos com esse trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM TAC

Característica	Valor	(%)
Idade (anos)		
< 4	153	59.8
4 a 12	65	30.0
13 a 20	36	10.2
Sexo		
Feminino	156	61.4
Masculino	98	38.6
Apresentação clínica		
Virilização	140	55.1
Síndrome de Cushing	14	5.5
Misto (clínico e hormonal)	74	29.2
Tumor não-funcional	26	10.2
Taxa meninas: meninos		
< 4 anos	1.7: 1	
4 anos a 12 anos	0.8: 1	
13 anos a 20 anos	6.2: 1	

FONTE: MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004.

NOTA: Neste estudo foram analisadas 254 amostras de TAC e 79,5% das amostras eram de pacientes da região sul do Brasil

* Indica evidência clínica e/ou histológica de produção anormal de mais de um hormônio, incluindo aldosterona ou estrógeno.

TABELA 2 - DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES DE TAC

Estágio	Descrição
I	Tumor completamente retirado; peso do tumor ≤ 200 g e ausência de metástases.
II	Tumor completamente retirado; peso do tumor > 200 g e ausência de metástases.
III	Tumor residual ¹ ou inoperável
IV	Metástase

FONTE: FONTE: MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004.

NOTA: ¹ Tumor residual é definido como a presença de tecido neoplásico microscópico ou não após a ressecção cirúrgica.

2.1.2 Desenvolvimento do córtex adrenal

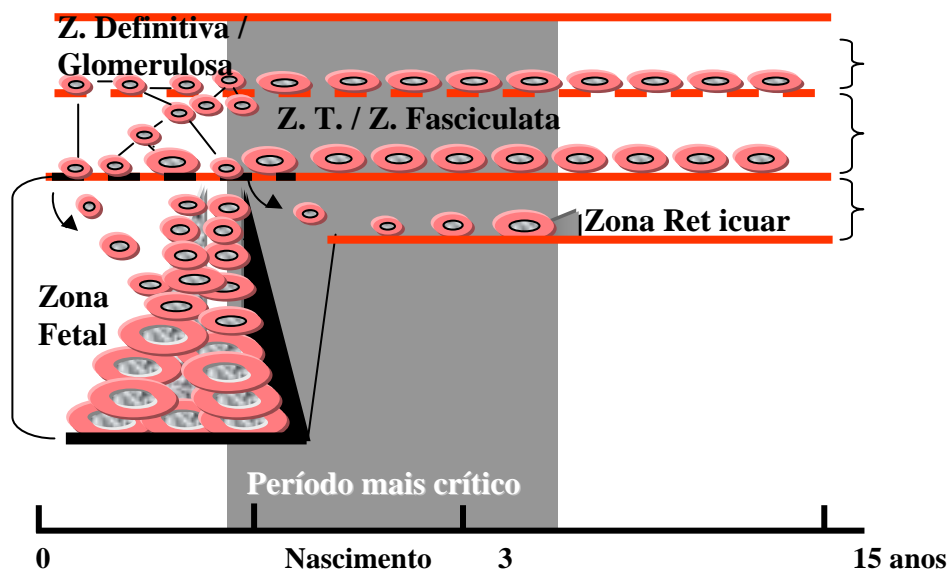
O córtex adrenal humano fetal é inicialmente composto de duas zonas morfológicamente distintas: a zona fetal e a zona definitiva (WOLKERSDORFER; BORNSTEIN, 1998). Após a metade da gestação, uma terceira região, a zona de transição, desenvolve-se entre a zona fetal e a definitiva. Próxima à trigésima semana, as zonas definitiva e de transição começam a apresentar a aparência da zona glomerulosa e da zona fasciculada do córtex adrenal adulto, respectivamente (figura 1).

A zona fetal, como o próprio nome diz, existe somente durante a embriogênese e, logo após o nascimento se inicia um intenso processo de atrofia. Uma camada interna aparece formando, inicialmente, a zona reticular que prolifera e se diferencia até atingir um estágio final de desenvolvimento no final da puberdade (MESIANO; JAFFE, 1997).

Ao nascimento, o peso da adrenal é de 10 g e em, aproximadamente, duas semanas, decorrente do processo de apoptose, diminui a 6 g. Há perda de peso durante os próximos sete dias, permanecendo o tamanho constante por aproximadamente dois anos. Ao mesmo tempo, a zona reticular começa a se expandir rapidamente e o tamanho da adrenal aos quinze anos é mais que o dobro que o da glândula fetal. Verifica-se, portanto, que o córtex adrenal fetal é um tecido dinâmico que sofre muitas mudanças, incluindo apoptose intensa seguida por rápida proliferação celular (figura 1).

A morte celular programada, chamada apoptose, é um processo responsável pela eliminação de células indesejáveis do organismo, seja devido a um remodelamento de tecido durante a embriogênese ou regulação de renovação celular, seja como estratégia de defesa contra determinados patógenos (STRASSER *et al.*, 1997).

FIGURA 1 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL



FONTE: FIGUEIREDO *et al.*, 2000

NOTA: A figura 1 representa o processo de proliferação das células das zonas definitiva e transitória (Z. T.), em contraste com a intensa programação de morte celular (apoptose) na zona fetal (em preto) e o surgimento de uma camada mais interna (zona reticular). Ocorre uma migração centrípeta das células (setas) para a região mais interna do córtex adrenal precedendo à fase de hipertrofia. O período hipotético mais provável para a formação do TAC (área retangular em cinza escuro), seguida por uma segunda fase crítica (área cinza claro) são propostos. Estes dois períodos críticos são baseados na faixa etária mais comum de diagnóstico e o tempo em que os sintomas começaram a se manifestar.

2.1.3 Etiopatogenia

Sugere-se que a origem do TAC pode estar relacionada a anormalidades no processo de proliferação celular e/ou programação da morte das células do córtex adrenal durante o seu desenvolvimento embrionário (LEFEVRE *et al.*, 1984; HARTLE *et al.*, 1997; SANDRINI *et al.*, 1997).

A hiperplasia adrenocortical se constitui em um processo policlonal, porém os TAC são geralmente lesões monoclonais (BEUSCHLEIN *et al.*, 1994). Isso indica a necessidade de alterações genéticas em *loci* específicos no genoma para a tumorigênese adrenal. Várias anormalidades cromossômicas são relacionadas a esse processo, incluindo os *loci* genômicos 11p e 17p (HENRY *et al.*, 1989; YANO *et al.*, 1989) que abrigam genes de supressão tumoral ou de função oncogênica do córtex

adrenal, dentre eles o *Tp53* (em 17q13.1) (MALKIN *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1984). No entanto, nenhum desses genes parece ser específico para a patogênese do TAC.

A proteína p53 é sensor de estresse celular e responde a uma variedade de condições potencialmente injuriantes, tais como raios ultravioletas, radiação ionizante, hipóxia, e hiperproliferação. Diferentes mutações de *Tp53* podem causar uma variedade de defeitos funcionais neste gene com diversas expressões clínicas. Foi relatada por BIRCH *et al.* (1988) a associação entre o tipo de mutação de *Tp53* e o fenótipo do câncer. A habilidade do mutante *Tp53* em conferir potencial tumorigênico está relacionada a sua função de transativação (LIN *et al.*, 1995).

A alta incidência de câncer em certas famílias está associada a mutações em células germinativas no gene *Tp53*. De fato, KLEIHUES *et al.* (1997) propuseram que o carcinoma de córtex adrenal na infância é “quase um diagnóstico de um alelo de *Tp53* mutante que foi herdado”.

Aproximadamente 90% dos TAC no estado do Paraná (dados não publicados) apresentam mutação idêntica em uma base (CGC→CAC) no exon 10 do gene *Tp53*. O resultado dessa mutação na linhagem germinativa é a substituição da arginina por uma histidina no aminoácido 337 (R337H). Este alelo mutante foi mostrado ser deficiente em pH alcalino e em temperaturas supra-fisiológicas (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002; HAINAUT, 2002).

A penetrância do alelo R337H no TAC é aproximadamente igual a 10% (FIGUEIREDO *et al.*, no prelo). Portanto, a mutação R337H *Tp53* na linhagem germinativa predispõe seletivamente uma criança ao carcinoma adrenocortical.

Os dados preliminares indicam que, uma em cada dez crianças com esta mutação, residentes no Sul do Brasil (numa proporção de quatro meninas para um menino), desenvolve TAC. No estado do Paraná e, provavelmente, no estado de São Paulo, a incidência de TAC é de 3,4 – 4,2/milhão (SANDRINI *et al.*, 1997). Este número representa, realmente, um dado estatístico relevante, pois a incidência mundial que é 0,3-0,38/milhão de crianças abaixo de 15 anos (GURNEY *et al.*, 1995). A segunda maior incidência de TAC, 0,64/milhão de crianças com idade inferior a 15

anos, foi relatada na região noroeste da Inglaterra entre 1965 e 1986 (BIRCH *et al.*, 1988).

Tem-se sugerido que fatores ambientais poderiam contribuir com o aparecimento de câncer e mutações somáticas (ZAHM *et al.*, 1998). O papel dos compostos agrotóxicos na patogênese do TAC é controverso (SANDRINI *et al.*, 1997) e, aparentemente, não possui relação com a mutação R337H *Tp53*. Essa especulação baseia-se no achado de que mutação no *Tp53* e em outros genes podem ser seletivamente induzida por agentes ambientais, como aminas aromáticas, benzopireno e aflatoxina B (NAGAO *et al.*, 1993; SORLIE *et al.*, 1998). No entanto, FIGUEIREDO *et al.* (2000), em um estudo realizado no estado do Paraná, demonstraram por meio de experimentos utilizando pesticidas e herbicidas em animais, que o papel dessas substâncias na tumorigênese adrenocortical ainda não está claro. Embora não se possa afirmar qual é a causa dessa neoplasia infantil, estudos ainda incompletos mostram que essa mutação surgiu há pelo menos 110 anos (RIBEIRO; FIGUEIREDO, no prelo).

Muitas das características epidemiológicas e clínicas observadas em tumor adrenocortical são diferentes quando se comparam pacientes infantis e adultos, sugerindo que são entidades diferentes e, provavelmente, causadas por processos etiológicos diferentes (RIBEIRO; FIGUEIREDO, no prelo). A apresentação clínica dessa patologia em crianças é caracterizada com marcante predomínio de síndrome virilizante com ou sem Síndrome de Cushing, ao passo que a grande maioria dos pacientes adultos é assintomática ou apresenta Síndrome de Cushing (HUVOS *et al.*, 1970; KING *et al.*, 1979; RIBEIRO; FIGUEIREDO, no prelo). Cerca de 90% dos tumores em adultos são benignos, enquanto que apenas 10% dos pacientes infantis recebem esse mesmo laudo histopatológico (RIBEIRO; FIGUEIREDO, no prelo). O principal parâmetro para prognóstico de TAC é o tamanho do tumor e o de adultos é a histologia do tecido (BUGG *et al.*, 1994). FIGUEIREDO *et al.* (1999) estudando amostras de TAC do sul do Brasil relataram a presença de uma amplificação em 9q34. Nesse *locus* se encontram alguns oncogenes relacionados ao surgimento de várias neoplasias, como hamartoma (VAN SLEGTENHORST *et al.*, 1997), carcinoma de

bexiga (HABUCHI *et al.*, 1995; HORNIGOLD, *et al.*, 1999) dentre outros. Em adultos foi verificado que essa amplificação ocorre menos freqüentemente que em crianças (KJELLMAN *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1999). Esses achados sugerem também uma origem diferenciada para tumor adrenocortical em crianças e adultos.

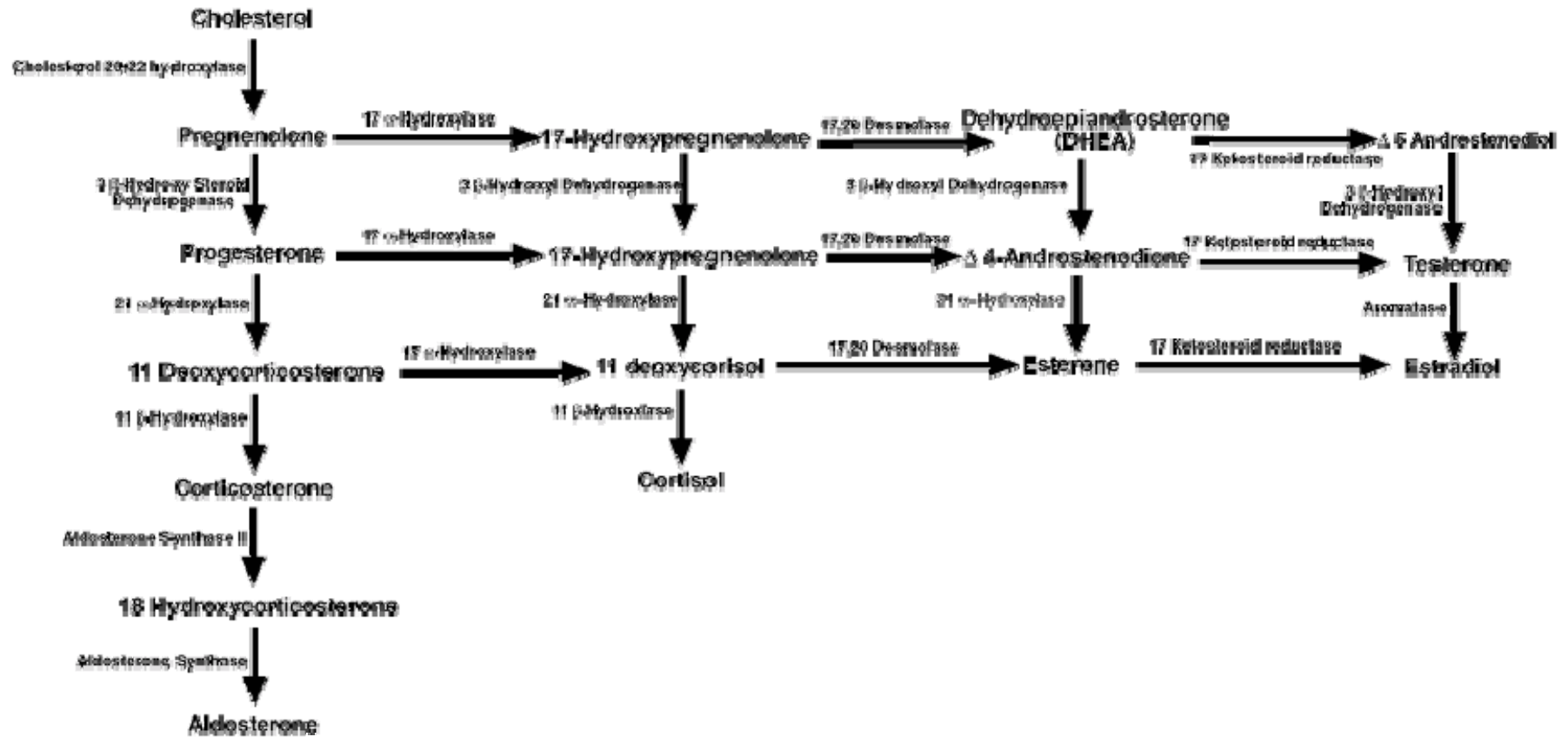
2.1.4 Papel da enzima 17 α -hidroxilase no córtex adrenal

A atividade esteroidal da enzima 17 α -hidroxilase (17-OHase) é catalizada por um complexo enzimático do retículo endoplasmático compreendendo uma citocromo P450c17 e uma flavoproteína NADPH-citocromo P450 redutase (HIWATASHI, ICHIKAWA, 1979). Este complexo é expresso pelas células adrenocorticais das zonas reticular e fasciculata, células de Leydig e folículos ovarianos (CHUNG, 1987; MILLER, 1988). Devido a sua presença somente em células que produzem esteróides, a enzima 17-OHase pode ser considerada um marcador de tecido esteroidogênico.

A enzima 17 α -hidroxilase citocromo P450 (P450c17) apresenta tanto uma atividade esteroidal, catalizando tanto a atividade de 17-OHase (figura 2), quanto atividade de desmolase (17,20-liase) (PURVIS *et al.*, 1973). Essas duas reações permitem a biossíntese de (1) glicocorticóides no córtex adrenal, em razão da atividade 17-hidroxilase, e de (2) esteróides C19 andrógenos no córtex adrenal e nas gônadas, pela atividade adicional de liase. A presença desse complexo enzimático nas células adrenocorticais permite a síntese de glicocorticóides e de esteróides C19 na própria glândula adrenal.

A característica de aceitar mais de um substrato, bem como a de produzir múltiplos produtos a partir de um único substrato, colocam as enzimas esteroidogênicas da adrenal e das gônadas em posição privilegiada no metabolismo de mamíferos (SWARTA *et al.*, 2003). Uma das mais notáveis enzimas nesse aspecto de múltiplos substratos e produtos é a citocromo P450c17 (NAKAJIN *et al.*, 1981). Dependendo do tecido e da espécie, essa enzima converte pregnenolona em progesterona e 17-hidroxiderivados e participa da reação de formação de dois esteróides sexuais: deidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona.

FIGURA 2 - BIODÍNTENSE DE HORMÔNIOS DO CÔRTEX ADRENAL



FONTE: CRUMP INSTITUTE FOR BIOLOGICAL IMAGING, UCLA

O gene que codifica o citocromo P450c17 se localiza no cromossomo 10 (MATTESON, 1986) e seu seqüenciamento e clonagem foram estudados amplamente estudados por PICADO-LEONARD; MILLER (1987). Nos últimos 5 anos, diferentes alterações moleculares no gene CYP17 em pacientes com deficiência de 17-OHase estão sendo descritas (YANASE *et al.*, 1988; KAGIMOTO *et al.*, 1988; YANASE *et al.*, 1989; KAGIMOTO *et al.*, 1989; YANASE *et al.*, 1990; WINTER, 1991; LIN *et al.*, 1991; BIASON *et al.*, 1992).

2.1.5 Diagnóstico e tratamento

Existe uma hipótese sobre a existência do TAC em pelo menos duas formas. O fato de que crianças mais jovens apresentam manifestações mais precoces da patologia, uma predominância de tumores virilizantes, juntamente às características histopatológicas da neoplasia (BUGG *et al.*, 1994) indicam que o tumor surgiu na zona fetal do córtex adrenal, no período pré-natal. A zona fetal representa 85% do córtex adrenal durante o desenvolvimento do feto e produz dehidroepiandrosterona, em razão da presença de 17-OHase (KEEGAN; HAMMER, 2002). Em contraste, o TAC que se desenvolve em adolescentes pode se originar da zona definitiva do córtex adrenal. É possível que a presença de *Tp53* mutante aumente a penetrância desse tumor na zona fetal, porém, não na definitiva. Essa premissa é consistente com o fato de que indivíduos com mutações constitucionais no gene *Tp53* (Síndrome de Li-Fraumeni), o TAC ocorre somente durante a primeira década de vida (KLEIHUES *et al.*, 1997).

Aproximadamente 12% dos casos de TAC são diagnosticados durante o primeiro ano de vida e 60%, antes dos quatro anos de idade (MICHALKIEWIEZ *et al.*, 2004). Há anos atrás o diagnóstico, na maioria dos casos era feito tardiamente (estágios III e IV) e, provavelmente a causa desse atraso era multifatorial. A primeira seria em razão da necessidade de um trabalho mais detalhado no sentido de buscar alterações endócrinas ainda quando o tumor está pequeno e produzindo leves manifestações clínicas. A segunda é que as crianças com TAC não aparentam estarem doentes, com exceção das alterações endócrinas. E, finalmente, o crescimento do

tumor pode ser muito lento, o que se observa em casos em que existe um longo espaço de tempo entre as primeiras manifestações clínicas percebidas na criança ou adolescente e a detecção do tumor (MICHALKIEWIEZ *et al.*, 2004). Essa última observação é consistente com o processo multifases da carcinogênese resultante do acúmulo de várias alterações genéticas (SHIH *et al.*, 2001).

O intervalo entre o surgimento dos sinais e sintomas e o diagnóstico não está relacionado ao prognóstico ou ao tamanho do tumor, por isso, o tamanho do tumor pode refletir a qualidade das anormalidades genéticas adquiridas. Por conseguinte, parece que existe uma fase inicial em que o tumor se desenvolve lentamente, caracterizada especialmente pelas manifestações endócrinas e ausência de massa tumoral palpável e, em seguida, uma progressão rápida do tumor (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

O início dos sintomas e o tamanho do tumor contribuem na avaliação do tempo de surgimento do TAC, que provavelmente ocorre próximo à fase de intensas transformações do córtex adrenal embrionário (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

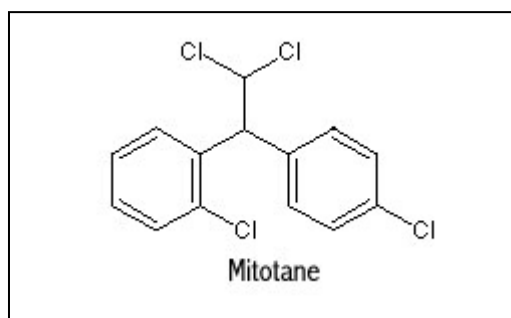
A glândula adrenal normal (sem tumor) produz, sob estímulos de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) sintetizado no hipotálamo, cortisol, androgênios, estrogênios e mineralocorticóides (FIGUEIREDO *et al.*, 2003). O diagnóstico de TAC é confirmado pelos exames de imagem (tomografia, ecografia ou ressonância magnética) e os testes laboratoriais utilizados como auxiliares ao seu diagnóstico revelam, geralmente, aumento de andrógenos e/ou cortisol.

O prognóstico do tratamento é regido pelo sucesso da cirurgia, forma de tratamento mais eficiente para o TAC (BRENNAN, 1987) e o único potencialmente curativo (CHUDLER; KAY, 1989). Em um registro internacional de TAC foi relatada uma sobrevida de, aproximadamente, 55% (MICHALKIEWIEZ *et al.*, 2004).

NELSON E WOODARD (1949) observaram que a administração do inseticida 1,1-di-(p-clorofenil)-2,2-dicloroetano (DDD) a cães produzia necrose seletiva nas zonas reticular e fasciculata do córtex adrenal. Dentre os diversos isômeros do DDD, o isômero o,p' é considerado o responsável pela atividade adrenocorticolítica desse inseticida (CUETO *et al.*, 1958). Mitotane (figura 3) é o

nome dado ao composto 1-(o-clorofenil)-1-(p-clorofenil)-2,2-dicloroetano (o,p' DDD) que se usa desde 1960 no tratamento de carcinomas adrenocorticais inoperáveis (NICHOLS *et al.*, 1957; BERGENSTAL *et al.*, 1960). LUBITZ *et al.* (1973) foram os primeiros a demonstrarem a resposta de tumores funcionais e não-funcionais ao mitotane.

FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL
DO MITOTANE



FONTE: FANG, 1979

O mecanismo de ação do mitotane ainda não foi elucidado, mas está bem estabelecido seu ataque seletivo sobre as mitocôndrias das células adrenocorticais, normais ou neoplásicas (KAMINSKY *et al.*, 1962; HART *et al.*, 1973; FANG, 1979).

Como a droga lesa o córtex adrenal, a administração de adrenocorticosteróides é indicada, em particular aos pacientes com evidência de insuficiência adrenal, choque ou trauma grave (HOGAN *et al.*, 1978).

FANG (1979) estudou uma linhagem clonal de células de carcinoma adrenocortical humano e constatou que em alguns estágios do ciclo celular essas células se mostram mais vulneráveis aos efeitos citotóxicos do mitotane. A partir destes achados acredita-se que alguns casos relatados de fracasso no uso de mitotane (LUBITZ *et al.*, 1973) deveu-se a uma dose inadequada da droga.

Além do mitotane, está indicada quimioterapia com etoposide, cis-platina e desoxirribicina para todos os pacientes nos estágios III e IV ou I e II que apresentarem recidiva.

2.2 FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA

2.2.1 Proteínas ancoradas por GPI

Muitas proteínas constitutivas celulares de eucariotos, desde fungos e protozoários até plantas e mamíferos, estão ancoradas à superfície externa da membrana plasmática por meio de um grupamento glicofosfatidilinositol (GPI) (McCOVILLE, FERGUNSON, 1993; HOOPER, 1997; FERGUNSON, 1999; ZHOU *et al.*, 2001). As proteínas ancoradas por GPI exercem ampla variedade de funções como adesão celular, antigenicidade, receptores de membrana e enzimas hidrolíticas (5'-nucleotidase, acetilcolinesterase, dipeptidase e fosfatase alcalina (EISENHABER *et al.*, 2001).

O grupamento GPI parece conferir algumas importantes propriedades às proteínas por ele ancoradas. Dentre essas propriedades inclui-se a liberação da membrana por fosfolipases C e D bacterianas (tanto endógenas quanto exógenas), permitindo a existência da proteína na circulação sem GPI (GRIFFITH *et al.*, 1991; HUANG *et al.*, 1991; METZ *et al.*, 1994; MOVAHEDI, HOOPER, 1997). LISANT *et al.* (1988) descreveram o papel deste grupamento no endereçamento de proteínas para as regiões apicais da superfície celular, permitindo às proteínas maior mobilidade na membrana plasmática (NODA *et al.*, 1997).

A presença de GPI também direciona a proteína para os *rafts* de lipídios (microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios) que se suspeita serem constituintes da membrana plasmática de células eucariotas (SIMONS, IKONEN, 1997; BROWN, LONDON, 2000). SCHROEDER *et al.* (1994) sugerem que ocorra interações entre as longas cadeias acilas de GPI com colesterol e esfingolipídio, justificando assim a presença das proteínas ancoradas por GPI nestes *rafts*.

As proteínas ancoradas à membrana por meio do grupamento GPI podem ser exclusivamente extracelulares, como PLAP, transmembranas ou ainda possuírem um domínio intracelular. Algumas GPI transmembrana apresentam funções relacionadas a receptores e, embora algumas percam sua porção transmembrana e intracitoplasmática,

a interação com estruturas presentes no citoplasma se mantém (MAKIYA; STIGBRAND, 1992a).

2.2.2 Fosfatases alcalinas

As fosfatases alcalinas catalisam a hidrólise de fosfomonoésteres com liberação de fosfato inorgânico e álcool (SCHWARTZ; LIPMANN, 1961). As funções das fosfatases alcalinas ainda não foram bem elucidadas. No entanto, suspeita-se que exista uma relação entre a presença de fosfatases alcalinas e processos de transporte celular, haja vista a presença dessas enzimas em células de órgãos em que a função de transporte é importante, como placenta, rins e intestino (McCOMB *et al.*, 1979).

As quatro isoformas de fosfatase alcalina (monoéster ortofosfórico fosfohidrolase, E.C.3.1.3.1) já descritas diferem entre si na estrutura, função, localização (MILLÁN; FISHMAN, 1995) e quanto ao reconhecimento antigênico (KOSMAS *et al.*, 1988; HAMILTON-DUTOIT *et al.*, 1990).

Essas isoenzimas são nomeadas de acordo com o tecido em que são expressas normalmente. Em humanos, três dessas isoenzimas são chamadas tecido-específicas: placentária (PLAP), intestinal e de linhagens celulares germinativas. Existe entre elas homologia de 90-98%, e seus genes encontram-se agrupados no cromossomo 2, bandas q34-q37. O quarto tipo de fosfatase alcalina não é específico de um tecido e pode ser expresso em tecido ósseo, hepático e renal. Essa isoenzima possui 50% de homologia com as outras três fosfatases e se localiza no cromossomo 1, bandas p36.1-p34 (MILLÁN *et al.*, 1982; MILLÁN, 1988; HARRIS, 1989; MILLÁN, 1992; NOURI, *et al.*, 2000). Em adultos saudáveis, aproximadamente 1% da atividade de fosfatase alcalina presente na circulação sanguínea é atribuída a PLAP (HIRANO *et al.*, 1987).

2.2.3 Fosfatase alcalina placentária

2.2.3.1 Características gerais

PLAP humana é uma proteína localizada na superfície externa da membrana celular (McCOMB *et al.*, 1979; TOKUMITSU *et al.*, 1981; JEMMERSON *et al.*, 1985), porém também pode ser encontrada no soro, fluidos e em certos tecidos de indivíduos normais ou pacientes com alguns tipos tumorais (SHINODA *et al.*, 1988; KANG *et al.*, 1989; KOYAMA *et al.*, 1989)

PLAP é expressa normalmente pelas células das microvilosidades do sinciciotrofoblasto a partir da décima segunda semana de gestação (MESSER, 1967; FISHMAN *et al.*, 1976). Essa enzima representa uma porção significativa da proteína total presente na membrana do trofoblasto em placentas a termo (DOELLGAST; BENIRSCHKE, 1979; JOHNSON *et al.*, 1981).

MAKIYA E STIGBRAND (1992a) assim como outros pesquisadores sugerem que PLAP está envolvida na transferência materno-fetal de imunoglobulina (Ig) G através da placenta (MAKIYA; STIGBRAND, 1992a; MAKIYA; STIGBRAND, 1992b; STEFANER *et al.*, 1997). Uma outra função dessa enzima seria a participação no processo de divisão celular (CHAN; STINSON, 1986; TELFER; GREEN, 1993a; DABARE *et al.*, 2000; SHE *et al.*, 2000) em células normais e em células tumorais (GREEN, 1993b; CHAN; STINSON, 1986; DABARE *et al.*, 2000; SHE, *et al.*, 2000). Essa hipótese deve-se talvez à atividade fosfatase contra proteínas fosforiladas (TELFER; GREEN, 1993b; BUTIKOFER *et al.*, 1999).

As duas principais formas de PLAP são expressas pela placenta de acordo com o tempo de gestação. Aquela que se encontra na placenta durante as primeiras semanas de gestação é conhecida como PLAP-like ou isoenzima Nagao (NAKAYAMA *et al.*, 1970). A partir da décima segunda semana de gestação

começa a ser expressa um outro tipo de fosfatase alcalina denominada PLAP. Em tecidos normais PLAP e PLAP-like são expressas, predominantemente, nos pulmões, cérvix, mamas (GOLDESTINE *et al.*, 1982b; McLAUGHLIN *et al.*, 1984b) e no timo e testículos (GOLDESTINE 1982a, MILLÁN *et al.*, 1982; McLAUGHLIN *et al.*, 1984b), respectivamente. Ambas enzimas são expressas em endométrios normais (NOZAWA *et al.*, 1984) e podem estar elevadas em pacientes com câncer.

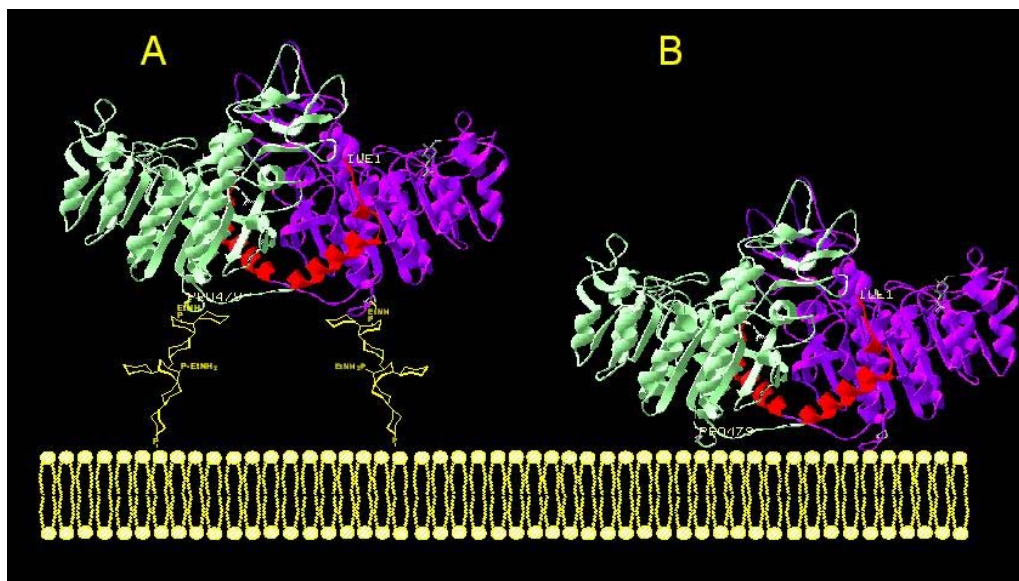
PLAP-like se difere de PLAP por migrar com menor velocidade em gel, apresentar uma maior inibição na presença de L-leucina (DOELLGAST; FISHMAN, 1976) e mostrar reatividade a certos anticorpos (McLAUGHLIN; JOHNSON, 1984a). É mais freqüentemente expressa em tumores de linhagens germinativas e em câncer de ovário, servindo como marcador tumoral em pacientes destes tipos tumorais (STIGBRAND; FISHMAN, 1984a).

Em razão da grande homologia (98%) entre PLAP e a isoenzima derivada das células germinativas, é difícil distingui-las somente pelos métodos tradicionais de análise de proteínas. OTTO *et al.* (1995) separaram-nas utilizando métodos de purificação por cromatografia seguido de eletroforese bidimensional.

2.2.3.2 Características estruturais

LEHTO E SHAROM (2002) demonstraram que PLAP se localiza muito próxima à região interfacial da bicamada lipídica. Nesse mesmo estudo verificou-se que sua conformação, possivelmente “*flop down*” (figura 4), possibilita uma modulação da enzima pela membrana celular. Por exemplo, GPI pode ser clivado por 5'-nucleotidase resultando na ativação catalítica da enzima. Entretanto, seu grau de ativação pode ser alterado quando modificada a natureza dos lipídios constitutivos da bicamada lipídica da membrana plasmática (LEHTO; SHAROM, 1998).

FIGURA 4 - MODELO DOS DÍMEROS DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA



FONTE: LEHTO; SHAROM, 2002

NOTA: (A) Modelo da estrutura cristalográfica do dímero de PLAP, mostrando os dois ancoramentos GPI em conformação estendida (modelo *lollipop*), em que o centro da proteína se encontra afastado da superfície. (B) O modelo mais provável do posicionamento de PLAP em relação à bicamada lipídica em uma conformação *flop down* na qual os dímeros se posicionam bem próximos à membrana da célula, proporcionando um contato direto com a bicamada lipídica. Nesse último modelo a atividade de PLAP pode ser modulada por essa bicamada.

PLAP é uma proteína modificada pós-transcricionalmente assim como outras fosfatases de mamíferos. Dentre essas alterações incluem-se dois sítios de *N*-glicosilação e um sítio para anexar-se à membrana com presença de GPI (LE DU *et al.*, 2001). É uma enzima alostérica e inibida não-competitivamente por alguns aminoácidos: L-fenilalanina, L-triptofano, L-leucina (HOYLAERTS *et al.*, 1982; HUMMER; MILLÁN, 1991; WATANABE *et al.*, 1991). Também é estável ao calor e hidrolisada por neuramidase. Todas essas características são úteis para distinguir PLAP das demais fosfatases alcalinas (FISHMAN, 1974; STINGBRAND; FISHMAN, 1984a; VENGEROV *et al.*, 1988). Todavia, foi relatada recentemente a existência, na doença de Hodgkin (DAMLE *et al.*, 1979) e em pacientes com câncer colorretal (HARMENBERG *et al.*, 1989), de uma variante de PLAP que é sensível ao calor.

Estudos cristalográficos em raio-X da estrutura de PLAP revelaram uma resolução de 1,8 Å (LE DU *et al.*, 2001). Confirmaram também algumas evidências de que PLAP se constitui em um homodímero (DURBIN *et al.*, 1988) (figura 4) e identifica vários resíduos que podem contribuir para sua propriedade alostérica (LE DU *et al.*, 2001).

Uma grande porção C-terminal, resíduos 480-513, e o grupamento GPI, que estariam ligados ao resíduo aspartato carboxi-terminal (C-terminal) (REDMAN *et al.*, 1984), não foram observados na estrutura de raio-X. Este resultado indica alto grau de flexibilidade da região C-terminal (LEHTO 2002).

A estrutura dimérica apresentada por LE DU *et al.* (2001) mostra que a porção N-terminal de um monômero, se localiza muito mais próxima da região C-terminal do outro monômero do que da região C-terminal dessa mesma sub-unidade. Estes dados são coerentes com a conformação de PLAP próxima à membrana com cada monômero muito próximo à bicamada lipídica (LEHTO; SHAROM, 2002) (figura 4)

O peso molecular de cada monômero da proteína PLAP encontra-se entre 58 KDa e 74 KDa (GOTTLIEB; SUSSMAN, 1968; STIGBRAND; FISHMAN, 1984b; EZRA *et al.*, 1983; ITO; CHOU, 1983; NOURI *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001; LE DU *et al.*, 2001; LETHO; SHAROM, 2002). ERIKSSON *et al.* (2001) por meio de eletroforese por capilar descrevem essa microheterogeneidade no peso molecular de PLAP, podendo ser explicada pela existência de várias glicoformas e/ou oligômeros da enzima.

2.2.4 O gene PLAP

A isoenzima Regan, primeira PLAP encontrada em células tumorais apresentava as mesmas características imunológicas, eletroforéticas e enzimáticas que a fosfatase alcalina originalmente expressa na placenta após a 12^a semana de gestação (DE GROOTE *et al.*, 1983). Este fato sugere que PLAP tumoral é um produto do mesmo gene que codifica essa proteína placentária normal. Portanto, a expressão

dessa isoenzima em tumores é, provavelmente, resultado da desrepressão do gene PLAP normal, e não a expressão de um gene específico do tumor (LOWE; STRAUSS, 1990).

Cada subunidade de PLAP madura se constitui em um peptídeo glicosilado de 513 aminoácidos (KAM *et al.*, 1985; HENTHORN *et al.*, 1986; MILLÁN, 1986) (figura 5). O precursor possui um peptídeo sinalizador com aproximadamente 22 resíduos que é clivado durante o processamento da enzima (ITO; CHOU, 1983). O gene que codifica este peptídeo sinalizador está no exon 1 e o que codifica o domínio de ancoramento GPI, no exon 11 (KNOLL *et al.*, 1988)

PLAP é codificada pelo gene *ALP-1*, membro de uma pequena família de genes localizados no braço longo do cromossomo 2 (MARTIN *et al.*, 1987). Nessa família estão incluídos os genes que codificam a fosfatase alcalina intestinal e *PLAP-like* (ALP-2) (KNOLL *et al.*, 1987). O gene que codifica PLAP, que não é específica de um tecido, está no cromossomo 1 (SWALLOW *et al.*, 1986). A evolução dessa família gênica tem, provavelmente, envolvimento de uma duplicação de um gene primordial de uma fosfatase alcalina (fígado, rim e ossos) para a geração da fosfatase alcalina intestinal. Novas duplicações deram origem aos genes ALP-1 e 2 (HARRIS, 1982).

Somente homens e símios superiores possuem fosfatase alcalina específica da placenta, os demais mamíferos expressam nas células da placenta o tipo de fosfatase alcalina não específica (fígado, rim e ossos). Em contraste, todos os mamíferos possuem a fosfatase alcalina específica do intestino e o tipo não específico, ambas muito semelhantes às isoenzimas humanas (DOELLGAST; BENIRSCHKE, 1979; GOLDSTEIN; HARRIS, 1979; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; GOLDSTEIN *et al.*, 1982a; HARRIS, 1982; DOELLGAST, 1984). PLAP apresenta polimorfismo, com três variantes comuns e, pelo menos, 15 alelos raros (ROBSON; HARRIS, 1965; ROBSON; HARRIS, 1967; HARRIS *et al.*, 1974; STINGBRAND *et al.*, 1983).

2.2.5 PLAP solúvel não tumoral

A liberação de PLAP da membrana pode ocorrer por meio da ação enzimática de fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (SLEIN; LOGAN, 1965; IKEZAWA *et al.*, 1976; LOW; FINEAN, 1977; YUSUFI *et al.*, 1983). JEMMERSON E STIGBRAND (1984a) relatam a possibilidade de outro tipo de liberação de PLAP para o meio pela ação da tripsina. Essa enzima faz com que a proteína nativa seja clivada por meio de um único sítio ativo, reduzindo seu peso molecular em 10 KDa. No entanto essa clivagem não afeta a atividade catalítica da fosfatase. A enzima bromelina também é capaz de liberar PLAP da membrana celular, porém ao retirar um fragmento de 2 KDa da região C-terminal faz com que a fosfatase perca sua atividade catalítica (JEMMERSON; STIGBRAND, 1984b).

NEUWALD E BROOKS (1981) a fim de estudar PLAP em células de coriocarcinoma, essas foram submetidas ao tratamento com tripsina. Percebeu-se que a proteína se tornara menos hidrofóbica e com maior velocidade de migração eletroforética. O peso molecular de PLAP em células não tratadas foi de, aproximadamente 70 KDa ao passo que, após o tratamento com tripsina o peso passou a ser 68 KDa. Portanto, a perda de hidrofobicidade e redução de cerca de 2 KDa no peso molecular da proteína permitiu uma similaridade com a PLAP sérica. Esta observação sugere que a forma solúvel de PLAP, encontrada no soro de pacientes, resulta de uma liberação da membrana celular em razão uma ação proteolítica e não por um processo secretório.

Relatou-se a existência de um tipo de PLAP que migrava mais lentamente em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (GHOSH; FISHMAN, 1968; BERATIS *et al.*, 1971; DOELLGAST *et al.*, 1977) e associou-se este achado à presença de dímeros solúveis de PLAP (NEUWALD; BROOKS, 1981). Segundo BERATIS *et al.* (1971) essa forma mais lenta pode ser convertida em outra mais rápida por autólise da amostra de placenta, por meio de aquecimento a 37° C por longo período de tempo.

LEHTO E SHAROM (2002) purificaram PLAP a partir de amostras de membrana plasmática de microssomas placentários, utilizando um método de extração em que se preservava a porção GPI da proteína. Os resultados nas análises de SDS-PAGE mostram a presença de uma banda de aproximadamente 74 KDa.

Uma pequena quantidade de PLAP alcança o sangue materno, seja devido à liberação direta pelas células, seja pelas microvilosidades sincitiotrofoblásticas que entram em contato com as veias uterinas (JOHNSON *et al.*, 1981). Os níveis sanguíneos de PLAP em mulheres grávidas se elevam progressivamente após o primeiro trimestre de gravidez até o parto (FISHMAN *et al.*, 1968a; SUSSMAN *et al.*, 1968; JACOB; BAGSHAWE, 1972).

MCLAUGHLIN *et al.* (1983) estudaram 208 mulheres grávidas e verificaram ampla variação nos níveis plasmáticos de PLAP em todas as idades gestacionais, embora houvesse aumento na média dos valores à medida que se aproximava do parto.

Os níveis séricos de PLAP-like se encontram elevados em fumantes (MASLOW *et al.*, 1983; TONIK *et al.*, 1983; MCLAUGHLIN *et al.*, 1984c). No entanto, em mulheres que não estejam grávidas e indivíduos não-fumantes, a atividade de PLAP é muito baixa, representando menos que 1% da atividade total de fosfatase alcalina (TONIK *et al.*, 1983; MUESCH *et al.*, 1986).

WILLIAMS *et al.* (1986) demonstraram que a principal fonte de PLAP-like no soro de pacientes fumantes de cigarro são as células pulmonares. A liberação da enzima deve-se a danos causados aos pneumócitos, seja pelas substâncias químicas presentes nos cigarros ou, indiretamente por meio da ação sistêmica dos metabólicos da nicotina. O ato de fumar parece estimular a liberação da enzima mais que sua síntese e a quantidade de PLAP-like detectável no tecido pulmonar é similar em fumantes e não-fumantes.

A liberação de PLAP é seletiva, haja vista a detecção apenas de PLAP-like no soro de fumantes (MCLAUGHLIN *et al.*, 1984c). No entanto, o tecido pulmonar contém também quantidades substanciais de PLAP. Este fato pode sugerir uma diferença na distribuição celular de PLAP e PLAP-like dentro do pulmão ou uma

possível modificação estrutural de PLAP pulmonar ao ser liberada para a circulação sanguínea como PLAP-like (WILLIAMS *et al.*, 1986)

2.2.6 PLAP como marcador tumoral

O processo de transformação neoplásica celular pode levar à expressão de proteína(s) específica(s) àquele tumor, ou a uma elevação no nível de expressão de uma determinada proteína quando comparado ao tecido normal. As células transformadas podem expressar antígenos normalmente presentes durante as fases embriônica e fetal (NORGAARD-PEDERSEN *et al.*, 1984). Como exemplo tem-se a α -fetoproteína presente no saco amniótico (GITLIN *et al.*, 1967) e detectável em tumores que se originam deste tecido (TSUCHIDA *et al.*, 1975) e em hepatoma e teratocarcinoma humanos ou experimentais (ABELEV *et al.*, 1971). Outro exemplo de antígeno oncoembriogênico é a gonadotrofina coriônica humana que é produzida em células de coriocarcinoma, mas também em neoplasmas sem origem trofoblásticas, como câncer pulmonar e seminomas, etc. (BRAUNSTEIN *et al.*, 1973).

Algumas fosfatases alcalinas são expressas, abundantemente, em células de certos tumores. PLAP é freqüentemente expressa em células tumorais de origem trofoblástica ou não (FISHMAN, 1987).

FISHMAN *et al.* (1968b) foram os primeiros a estabelecerem a relação entre PLAP e a presença tumores. Neste estudo, os níveis elevados de PLAP (isoenzima Regan) foram associados à carcinoma broncogênico. Desde então, vários estudos têm confirmado a produção ectópica dessa isoenzima por vários tumores, como carcinoma broncogênico (DEBORE; POLLET, 1988), câncer colorctal (POLLET *et al.*, 1985), tumores do trato gastrointestinal (NATHANSON; FISHMAN, 1971; JACOB; BAGSHAW, 1972; LOOSE *et al.*, 1984), de ovários e de testículos (MCDICKEN *et al.*, 1965; NATHANSON; FISHMAN, 1971; EERDEKENS *et al.*, 1985; POLLET *et al.*, 1985; BRIERS *et al.*, 1986; BROE *et al.*, 1986), de células hematopoiéticas (DAMLE *et al.*, 1979), de pâncreas (NATHANSON; FISHMAN *et al.*, 1971) e da glândula adrenal (NATHANSON; FISHMAN *et al.*, 1971).

Alguns resultados encontrados indicam que PLAP pode ser empregada como marcador de diferenciação, pois em algumas linhagens celulares de seminomas, quanto maior o grau de diferenciação, maior o nível de expressão de PLAP (TELFER; GREEN, 1993a; NOURI *et al.*, 2000). Este fato explicaria as diferenças na resposta clínica ao tratamento de alguns tipos de tumores de testículos (OLIVER, 1998; NOURI *et al.*, 2000).

Sensibilidade de 51% de PLAP para seminoma foi demonstrada por KOSHIDA *et al.* (1996). Neste estudo, não houve diferença significativa entre a taxa de detecção positiva ou nível do marcador entre o grupo de fumantes e o de não-fumantes. A taxa de falsos-positivos encontrada neste estudo para PLAP foi de 1,8%, valor comparável aqueles encontrados quando se utilizam os marcadores tumorais não influenciados pelo hábito de fumar.

Embora PLAP esteja presente em vários tecidos tumorais, em alguns pacientes com câncer de ovário ela não foi detectada no soro, especialmente nos estágios iniciais da doença (MANO *et al.*, 1986). Nesse mesmo estudo foi demonstrada a elevação nos níveis séricos de PLAP de uma paciente com antecedência de dois anos ao diagnóstico.

LOWE E STRAUSS (1990) relataram em um estudo a existência de uma isoenzima Nagao em pacientes com coriocarcinoma. No entanto, diferente ao que se encontra freqüentemente em pacientes com seminoma, essa enzima não foi detectada no soro. As possíveis explicações para este achado são: (1) a não expressão nas células de coriocarcinoma de uma fosfolipase para clivar especificamente o grupamento GPI dessa isoenzima; (2) menor disponibilidade da isoenzima para a ação da fosfolipase; (3) a fração PLAP solúvel seria produto de outro gene ou o resultado do *splicing* alternativo do RNA (FERGUNSON; WILLIAMS, 1988).

2.3 CD30

2.3.1 Características gerais

CD30 é uma glicoproteína transmembrana membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) (DÜRKOP *et al.*, 1992) e a clonagem do cDNA de seu ligante revelou pertencer à superfamília TNF (SMITH *et al.*, 1993). Seu peso molecular varia entre 105-120 KDa e deriva de um precursor glicosilado de 90 KDa. A clivagem por metaloproteinase gera um peptídeo de 80 KDa (NAWROCKI *et al.*, 1988).

CD30 em humanos possui 595 aminoácidos e os resíduos extracelular e citoplasmático consistem de 362 e 188 resíduos, respectivamente (HORIE; WATANABE, 1998). O gene da proteína localiza-se no cromossomo 1 (1p36) como outros membros da superfamília dos TNFR (FONATSCH *et al.*, 1992).

2.3.2 Expressão e funções

As moléculas pertencentes à superfamília TNFR (CD30, CD27, CD40, CD95, OX40, TNFR1 e 2) são importantes nos processos de imunorregulação e foram, inicialmente, identificadas em células Reed-Sternberg da doença de Hodgkin, utilizando-se anticorpos Ki-1 (KAUDEWITZ *et al.*, 1986). Posteriormente, este antígeno também foi descrito em linfomas não-Hodgkin e linfoma de células gigantes anaplásicas (SCHAWB *et al.*, 1982).

Geralmente a expressão dessa proteína está restrita a linfócitos (T CD8 +, B em áreas parafoliculares). Em condições benignas as células ativadas (linfócitos B e T; células T infectadas pelos vírus: HIV, HTLV e por EBV) (STEIN *et al.*, 1985; SCHAWARTING *et al.*, 1989; ELLIS *et al.*, 1993; ITO *et al.*, 1994; FALINI *et al.*, 1995). Análises histológicas de CD30 demonstram sua expressão em células linfóides gigantes em cortes de linfonodos, tonsila, timo e células endometriais da decídua na interface placentária (DÜRKOP *et al.*, 2000)

As desordens associadas a níveis elevados de CD30 são: infecções virais, doenças autoimunes, artrite reumatóide (GERLI *et al.*, 2000), neoplasmas hematolinfóide (doença de Hodgkin, linfoma de células gigantes anaplásticas, etc.), carcinoma embrionário e tumores mesenquimais (rabdomiossarcomas, osteossarcomas, etc.) (PALESSEN *et al.*, 1988; MECHTERSHEIMER, MOLLER 1990; LATZA *et al.*, 1995) e seminomas (HITTMAYER *et al.*, 1996; SUSTER *et al.*, 1998).

A função de CD30 é mediar sinais que originarão diversos efeitos biológicos, dependendo da célula-alvo: (1) em células T ativadas é co-estimulador mitogênico, indutor da produção de citocinas (SMITH *et al.*, 1993; BOWEN *et al.*, 1996; GILFILLAN *et al.*, 1998); (2) em células B ativadas estimula a proliferação, induz a secreção de imunoglobulinas (GRÜSS *et al.*, 1994); (3) na doença de Hodgkin promove mitose, induz a expressão de CD54, estimula a produção de interleucina 6 (FALINI *et al.*, 1995); (4) em células de linfoma apresenta efeito antiproliferativo e induz agregação (GRÜSS *et al.*, 1994).

CD30 pode ser útil como marcador para diferenciar funcionalmente distintas sub-populações de células T. Análises de CD30 em células malignas se constituem em ferramenta útil para diagnóstico e classificação de linfomas e ainda como base para imunoterapia sendo o alvo (ENGERT, 1990; TAZZARI, 1992). Com relação aos tumores cujas células expressam essa proteína, uma das questões importantes a serem respondidas é se a superexpressão de CD30 é relevante para a patogênese e/ou fisiopatologia da neoplasia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A proximidade do diagnóstico de tumor adrenocortical de crianças (TAC) ao período de desenvolvimento do córtex adrenal, associado a todas as diferenças com o tumor de córtex adrenal de adultos, sugere uma origem embrionária para parte dos TACs. A fim de se testar tal hipótese, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar um marcador embrionário em amostras de TAC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar dois marcadores embrionários já conhecidos para tumores esteroideogênicos (PLAP e CD30), pela técnica de imunohistoquímica (IH) em cortes de parafina de TAC.
2. Investigar, pela técnica de *western blotting*, o(s) marcador(es) que apresentar(em) resultado positivo na IH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS

Sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (ANEXO 1 e 2) foram utilizadas amostras de pacientes com TAC com idade inferior ou igual a 15 anos na data do diagnóstico histológico de tumor (adenoma, carcinoma ou de histologia indefinida). Os responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Esclarecido (ANEXO 3) autorizando a utilização da amostra de tecido tumoral da criança no estudo.

Os médicos (hematologista, oncologista e endocrinologista pediátrico), cuja participação nesse estudo foi estritamente voluntária, foram os responsáveis por fazer o contato com os responsáveis legais pelo paciente de TAC e incentivá-los a procurarem o nosso grupo de pesquisa. Os pacientes se mantiveram anônimos durante todo o estudo.

Os critérios de exclusão deste estudo foram perda de contato com o médico ou com o paciente e desejo de descontinuidade por parte de paciente ou seu guardião legal.

As amostras utilizadas se constituíram em material de descarte de cirurgias dos pacientes que apresentaram de 10 dias a 15 anos de idade no dia da cirurgia.

As amostras já estavam disponíveis em blocos de parafina ou foram congeladas a -85° C. Entretanto apenas duas amostras foram consideradas em bom estado de preservação para serem submetidas à análise por *western blotting*.

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

2.2.1 Características do método

A imunohistoquímica (IH) se constitui em uma importante ferramenta para a avaliação de neoplasmas. As técnicas mais comuns de IH utilizam enzimas, como *horseradish peroxidase* (HRP) ou fosfatase alcalina, em conjugação com anticorpos específicos ao antígeno de interesse. O uso do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) é o mais difundido, embora a substituição de avidina por estreptoavidina aumente a sensibilidade do método e promova um número menor de ligações não específicas (CARTUN; PEDERSEN, 1998).

A sensibilidade de um método de IH é em grande parte devido aos reagentes e aos procedimentos empregados. Como consequência, torna-se difícil comparar resultados de estudos imunohistoquímicos de diferentes instituições ou laboratórios que empregaram diferentes reagentes ou diferentes métodos.

Virtualmente, qualquer material biológico pode ser submetido a uma análise por IH, incluindo tecidos frescos congelados, tecidos fixados e preparações citológicas. No entanto, não são todos os antígenos que se mantêm bem preservados após os vários tratamentos da técnica de IH, cujo resultado depende do antígeno de interesse. Por exemplo, enquanto um grande número de antígenos citoplasmáticos é detectado em tecido fixado e embebido em parafina, outros antígenos, a exemplo de alguns presentes em superfície de membrana, são destruídos ou mascarados pelos fixadores comumente utilizados, e podem ser detectados somente em tecido fresco congelado ou em preparações citológicas. O tipo de fixador empregado também pode alterar a afinidade do antígeno pelo anticorpo. Em algumas situações em que se procura por antígeno de filamento intermediário, o formaldeído deve ser substituído pelo álcool.

As técnicas de IH podem ser úteis também na determinação do sítio de origem de metástases tumorais. Até o momento não se descobriram muitos antígenos que são

tecido- ou órgão-específicos, o que dificulta muito a identificação de uma metástase tumoral.

4.2.2 Principais aplicações em oncologia

Um dos empregos mais comuns de IH é no diagnóstico e classificação de leucemias e linfomas.

Uma grande variedade de antígenos com possível importância para prognóstico ou terapêutica podem ser detectados pela IH, dentre eles os receptores de estrógeno e progesterona no câncer de mama (PERTSCHUK *et al.*, 1988; SYMPOSIUM, 1984; BATTIFORA, 1994), proteínas produtos de oncogenes, como HER-2/neu em câncer de mama (VAN DE VIJVER, 1988; SLAMON, 1989; ROSS, FLETCHER, 1998), antígenos associados à proliferação de células tumorais, como Ki-67 (GARCIA *et al.*, 1989; GERDES *et al.*, 1986) e as fosfoglicoproteínas produtos de gene de resistência a múltiplas drogas (WEINSTEIN *et al.*, 1990). Ki-67, antígeno nuclear presente em todas as células em proliferação, é de especial interesse (MAURI *et al.*, 1994) e a determinação desse antígeno fornece informações sobre a taxa de proliferação celular.

As principais limitações da técnica de IH são aquelas relacionadas à própria técnica e à interpretação dos resultados. É fundamental utilizar sempre um controle positivo e outro negativo para que se possa garantir resultados mais confiáveis. Os controles também são úteis no momento da interpretação dos resultados, uma vez que em alguns casos fica muito difícil diferenciar os casos negativos e os fracamente positivos.

As principais aplicações da IH no diagnóstico oncológico estão listadas no quadro 1.

QUADRO 1 - PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA IMUNOHISTOQUÍMICA EM DIAGNÓSTICO ONCOLÓGICO

1. Categorização de tumores malignos não diferenciados
2. Determinação de sítios de origem de metástases tumorais
3. Subclassificação de tumores em vários sistemas de órgãos e compartimentos de tecidos (por exemplo, tumores do sistema nervoso central, tumores de linhagem germinativa, sarcomas)
4. Distinção entre carcinomas e mesoteliomas malignos
5. Classificação de leucemias e linfomas
6. Detecção de antígenos potencialmente importantes para prognóstico e terapêutica
a. Receptores de estrógeno e progesterona
b. Produtos de oncogenes ou gene supressor tumoral
c. Marcadores de atividade proliferativa.

FONTE: CONNOLLY *et al.*, 2000.

4.2.3 Análise imunohistoquímica em cortes de parafina

Dentre as amostras de TAC utilizadas na IH, duas amostras eram de pacientes com tumores “não-funcionantes”, classificação essa baseada em dados levantados de produção hormonal e apresentação de sintomas clínicos de síndrome virilizante com ou sem Síndrome de Cushing. Portanto, das amostras em estudo 95% eram de “tumores funcionantes”.

Primeiramente as amostras tumorais e o tecido adrenocortical normal (controle negativo para as pesquisas de p53, CD30 e PLAP) foram fixados em uma solução formalina/tampão fosfato (10%) e, em seguida, embebidos em parafina.

Dois cortes de 4 µm de espessura de cada amostra de tecido foram montadas em cada lâmina e um total de quatro lâminas/paciente foram preparadas a fim de incubá-las com os quatro anticorpos separadamente: 17-OHase, p53, PLAP e CD30.

Os marcadores 17-OHase e p53 foram utilizados nesse trabalho a fim de se verificar o estado de preservação das amostras de tecido em estudo.

O procedimento para preparo das lâminas, executado à temperatura ambiente, foi adaptado de SHINODA *et al.* (1985) com modificações e é descrito a seguir:

1. Os tecidos nos blocos de parafina foram cortados em fragmentos com aproximadamente 4µm e transferidos para lâminas de vidro. Essas

permaneceram na estufa (37° C) por, aproximadamente, 15 minutos a fim de que os cortes aderissem à lâmina.

2. Para retirar a parafina dos cortes histológicos, as lâminas foram submetidas a três banhos (30 minutos cada um) em xilol, à temperatura ambiente.
3. A hidratação dos cortes foi feita em banhos com solução hidroalcoólica, com gradiente decrescente de etanol até 70%, sendo três banhos de cinco minutos para cada solução. A seguir lavaram-se as lâminas em água destilada por cerca de 10 minutos.
4. Em razão da necessidade de inativação da peroxidase endógena, pois ela é a enzima utilizada para a revelação, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (30%) e metanol (70%) na proporção de 1:10. Em seguida foram imersas em tampão fosfato (PBS, 0,2 M, pH 7,2) por, aproximadamente 15 minutos, repetindo este procedimento duas vezes.
5. Após o bloqueio dos sítios inativos com soro fetal bovino por 20 minutos, os cortes foram incubados *overnight* em ambiente úmido a 4° C com anticorpo primário (diluído em PBS na proporção de 1:50). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-17-OHase: Ig G obtida de soro de coelho purificado (gentilmente cedido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de Nashville, Tennessee - E.U.A.); anti-p53, anti-CD30 e anti-PLAP: Ig G produzidas em camundongos).
6. As lâminas foram lavadas em PBS (cinco vezes de 10 minutos cada) e incubadas *overnight* em ambiente úmido a 4° C com o anticorpo secundário (com exceção do anticorpo secundário utilizado para detecção de p53, que foi produzido em coelho, os demais foram obtidos a partir de

ovelha) conjugado à biotina. A diluição foi feita em PBS, na proporção de 1:50.

7. Novamente as lâminas foram lavadas em PBS (cinco vezes de 10 minutos cada) e incubadas com o complexo estreptoavidina-peroxidase por 20 minutos. Em seguida procedeu-se às lavagens em PBS.
8. A revelação foi feita acrescentando uma solução do substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB) e para contra-coloração utilizou-se hematoxilina.
9. Os cortes foram mergulhados em solução hidroalcoólica com gradiente crescente de etanol até 99% e, em seguida, lavados em xilol (três banhos de dois minutos cada).
10. Após secagem utilizou-se bálsamo do Canadá para selar a lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico comum.

4.3 PESQUISA DO ALELO R337H *TP53*

A análise de DNA de parte das amostras de sangue de pacientes com TAC já havia sido realizada em outro estudo, contudo com dados não publicados. Os métodos de extração, amplificação de DNA de leucócitos e digestão com a enzima de restrição utilizados nesse trabalho foram adaptados de RIBEIRO *et al.* (2001), como descritos a seguir.

A) Extração de DNA:

1. Amostras (2 mL) de sangue de 40 pacientes foram colhidas em ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) e centrifugadas a 1.800 rpm durante 15 minutos.

2. Aproximadamente 500 μ L das células separadas no procedimento anterior foram transferidos para um tubo de 1,5 mL e após homogeneização, adicionou-se tampão A (0.32 M sacarose, 10 mM Tris HCl pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$ e 1 % Triton-X-100).
3. Após centrifugação a 10.000 rpm por dois minutos, o sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi repetido com tampão de lise até que o precipitado se tornasse claro. O precipitado foi bem homogeneizado em água bidestilada e centrifugado a 10.000 rpm por dois minutos.
4. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se tampão proteinase K, proteinase K, SDS e água bidestilada. Homogeneizou-se bem e a suspensão foi incubada a 60° C por 30 minutos.
5. Adicionou-se solução saturada de NaCl (6 M) e centrifugou-se a 10.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 1 mL de etanol absoluto para precipitar do DNA (MILLER *et al.*, 1988). Centrifugou-se novamente e após descarte do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de solução hidroalcoólica (70%), seguida de nova centrifugação.
6. O DNA precipitado foi ressuspendido em água bidestilada em estocado a -20° C até o uso.

B) Reação de Polimerase em cadeia (PCR) e digestão com enzima de restrição

1. Acrescentou-se entre 100-200 ng de DNA genômico em um tubo contendo água bidestilada, tampão de PCR, Taq polimerase, *primers* e desoxirribonucleotídeos. Os *primers* utilizados foram os seguintes: 5'-CTG AGG CAC AAG AAT CAC-3' (*forward*) e 5'-TCC TAT GGC TTT CCA ACC-3' (*reverse*).

2. A região de estudo foi o fragmento de DNA com 447pb que compreende o exon 10 do gene *Tp53*. Após a desnaturação das amostras (4 minutos a 95°C), seguem-se 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento de primers a 62°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos).
3. Um período final de extensão (10 minutos a 72°C) encerra a amplificação. A qualidade do material amplificado é averiguada mediante eletroforese em gel de agarose 1,8%.
4. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à digestão com uma endonuclease de restrição (*HhaI*) que é capaz de clivar o alelo normal (wild-type *Tp53*), mas não cliva o alelo R337H mutante. Para verificar a presença da mutação os produtos da digestão são separados em gel de agarose 1,8% (contendo brometo de etídio), sendo esperadas duas bandas (154 e 293pb) para os alelos normais e uma banda (447pb) para os alelos mutantes.

4.2 ANÁLISE DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE E *WESTERN BLOTTING*

4.1.1 HISTÓRICO

SMITHIES demonstrou em 1955 que um gel preparado entre duas placas de vidro poderia ser utilizado como peneira molecular, na qual através de uma zona eletroforética, as proteínas poderiam ser carregadas (SMITHIES, 1955). Desde então, a técnica de análise de proteínas por eletroforese em gel vem se aprimorando: a introdução do gel de poliacrilamida (RAYMOND; WEINTRAUB, 1959); o sistema de tampão descontínuo (DAVIS, 1964; ORNSTEIN, 1964); o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS) para: (1) solubilizar e desagregar os complexos protéicos antes de

submetê-los à eletroforese (SUMMERS *et al.*, 1965), e (2) para adição nos tampões descontínuos (LAEMMLI, 1970; NEVILLE, 1971). Todos esses melhoramentos vêm contribuindo para que essa técnica seja uma das mais utilizadas para análise e separação de proteínas (GERSHONI; PALADE, 1983).

Inicialmente, a eletroforese em gel era utilizada com o objetivo de monitorar visualmente a homogeneidade ou heterogeneidade de uma mistura de proteínas a partir do surgimento de bandas no gel (GERSHONI; PALADE, 1983). Eletroforese em géis unidimensionais são mais adequadas ao estudo de amostras relativamente simples, como por exemplo, vírus (SUMMERS *et al.*, 1965), bacteriófagos (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973) e membranas de eritrócitos (FAIRBANKS *et al.*, 1971). Para amostras mais complexas são indicados os géis bidimensionais (KALTSCHMIDT; WITTMAN, 1970; METS; BOGARAD, 1974).

A identificação de uma proteína no gel era possível, porém requiritava grande quantidade de reagente (anticorpo), cuidados na manipulação do gel, extensivas incubações, muitas lavagens e muito tempo (GERSHONI; PALADE, 1983).

Para diminuir as dificuldades acima apresentadas, a exemplo da técnica de *Southern blotting* (SOUTHERN, 1975), as proteínas passaram a ser transferidas para uma membrana de nitrocelulose para então serem reveladas (ERLICH *et al.*, 1979; RENART *et al.*, 1979; BITTNER *et al.*, 1980; BOWEN *et al.*, 1980; SCHALTMAN; PONGS, 1980; STELLWAG; DAWBERG, 1980).

As três principais forças capazes de promover a migração das proteínas do gel para a membrana são difusão (BOWEN *et al.*, 1980; LEE *et al.*, 1982), convecção (SOUTHERN, 1975) e a mais difundida que é a eletroeluição (ARNHEIM; SOUTHERN, 1977; TOWBIN *et al.*, 1979; BITTNER *et al.*, 1980; STELLWAG; DAHBERG, 1980). Essa última é possível, pois as proteínas, ao contrário do DNA, são absorvidas pela nitrocelulose mesmo em condições de baixa força iônica (GERSHONI; PALADE, 1983).

As condições da transferência são dependentes do tipo de gel, da matriz imobilizadora, do equipamento e das próprias proteínas (GERSHONI; PALADE 1983). Gel com uréia (TOWBIN *et al.*, 1982), com SDS (BURNETTE, 1981; HOWE;

HERSHEY, 1981; GERSHONI; PALADE, 1982a; TOWBIN *et al.*, 1982), com lítio dodecil-sulfato (GERSHONI; PALADE, 1982b), não-desnaturantes (KAKITA *et al.*, 1982), bidimensionais (FRANKE *et al.*, 1981; SYMINGTON *et al.*, 1981; ANDERSON *et al.*, 1982) e de agarose (McMICHAEL *et al.*, 1981) podem ser utilizados para análise de proteínas por eletroforese em gel.

Existem alguns tipos de matrizes imobilizadoras empregadas nos processos de transferências de moléculas: membrana de nitrocelulose (mais utilizada), celulose modificada com diazobenziloximetil e membranas de *nylon* (mais apropriada para transferência de ácidos nucleicos) (GERSHONI; PALADE, 1983).

Proteínas de baixo peso molecular se ligam fracamente à membrana de nitrocelulose, por isso podem ser perdidas durante a transferência (KAKITA *et al.*, 1982). Para se evitar essa perda, pode-se utilizar uma matriz menos porosa (0,22 µm ao invés de 0,45 µm) (BURNETTE, 1981)

A fim de se verificar a eficiência da transferência, as membranas podem ser coradas com amido *black* 10B (TOWBIN *et al.*, 1982), *Comassie Brilliant Blue* (BURNETTE, 1981), anilina *blue black* (BOWEN *et al.*, 1980), *Ponceau S* (MUILERMAN *et al.*, 1982), *fast green* (REINHART; MALAMUD, 1982) ou toluidina *blue* (TOWBIN *et al.*, 1982).

Uma das maiores vantagens no uso de membranas em detrimento do gel para revelação é a praticidade para armazenamento e reutilização em outras reações (GERSHONI; PALADE, 1983). Se se submeter a membrana a uma redução no pH ou à incubação com agente desnaturante como a uréia, SDS, β-mercaptoetanol ou tiocianato de potássio (REISER; WARDALE, 1981; SYMINGTON *et al.*, 1981; GULLICK; ANDERSON *et al.*, 1982; ERIKSON *et al.*, 1982; LINDSTROM, 1982), ocorrerá uma dissociação da ligação antígeno-anticorpo (LEGOCKI; VERMA, 1981; OLMSTED, 1981). Esse processo é conhecido como *stripping* ou *Erasable Western blot* (KAUFMANN *et al.*, 1987). Todas essas técnicas podem ser executadas mesmo após a revelação em raio-X (GERSHONI; PALADE, 1983). As membranas poderão ser estocadas de 6 meses a 1 ano para novas análises (REISER; WARDALE, 1981; LEE *et al.*, 1982; GERSHONI; PALADE, 1982a).

Atualmente, os principais empregos dos *blots* de proteína são: (1) demonstração de interações proteína-proteína ou proteína-ligante (BOWEN *et al.*, 1980; BELL; ENGVALL, 1982; FERNANDEZ-POL, 1982; GERSHONI; PALADE, 1982b; GORELICK *et al.*, 1983; HAWROT *et al.*, 1982; HOCH, 1982); (2) identificação de subunidades de enzimas (MUILERMAN *et al.*, 1982); (3) purificação de anticorpos monoespecíficos (OLMSTED, 1981); (4) demonstração de interações célula-proteína (HAYMAN *et al.*, 1982).

4.2.1 Preparo das amostras

O método “SDS-PAGE” descrito por LAEMMLI (1970) proporcionou uma migração de proteínas dependente apenas de seu peso molecular, haja vista a presença de SDS, detergente carregado negativamente que se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas. Assim, surgem longas cadeias polipeptídicas com a neutralização da carga intrínseca das proteínas. A utilização de β -mercaptoetanol, um agente redutor, rompe as ligações dissulfeto dessas cadeias permitindo assim que as subunidades protéicas sejam analisadas independentemente.

Para preparar as duas amostras de tecido de TAC que foram submetidas à eletroforese, utilizou-se o tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) (com inibidor de protease) preparado no momento do uso e deixado em banho-maria a 100° C por, aproximadamente, 30 minutos antes de ser acrescentado às amostras de tecido.

Após este tempo, as amostras foram homogeneizadas exaustivamente em tampão Laemmli. Algumas amostras foram congeladas após este procedimento e outras, após atingirem a temperatura ambiente, foram submetidas à eletroforese.

4.2.2 Eletroforese

As duas amostras, em tampão Laemmli, foram aplicadas no gel de poliacrilamida/bisacrilamida nas seguintes quantidades: 50 μ L de cada amostra: TAC e do controle negativo (tecido de adrenal normal); 10 μ L de um dos controles positivos

(placenta humana a termo). Também foi utilizado como controle positivo um padrão comercial de PLAP diluído em tampão Lemmli na concentração que variou entre 2,5 e 5 µg.

O gel de resolução foi preparado à concentração de 10% (v/v) e as amostras foram submetidas a uma corrente constante de 200 V. O método utilizado neste estudo foi modificado a partir do descrito por DELMAS *et al.* (1993).

O peso molecular de cada monômero de PLAP pode variar de 58 KDa a 74 KDa (GOTTLIEB; SUSSMAN 1978; ERICKSSON *et al.*, 2001; LE DU *et al.*, 2001; NOURI *et al.*, 2000; STIGBRAND 1984b; ITO, CHOU, 1983; EZRA *et al.*, 1983) e para determinar a posição da proteína de interesse no gel de poliacrilamida usou-se um marcador de peso molecular. Após a corrida eletroforética, uma parte do gel (aproximadamente entre 40 e 100 KDa) foi cortada para que as proteínas contidas nesse fragmento de gel fossem submetidas à transferência.

4.2.3 *Western blotting*

4.2.3.1 Transferência para a membrana

Os fragmentos de gel de poliacrilamida permaneceram mergulhados em tampão de transferência por 20 minutos a fim de evitar alterações no tamanho do gel e de remover os excessos de sais e detergentes do tampão de corrida. As membranas de nitrocelulose foram recortadas do tamanho do gel e colocadas em tampão de transferência por 10 minutos. Em seguida géis e membranas foram colocados no equipamento de transferência. A amperagem, a voltagem e o tempo de transferência foram regulados de acordo com instruções do fabricante do equipamento.

4.2.3.2 Incubação com anticorpos

Após a transferência as membranas foram coradas com solução de Vermelho de *Ponceau* a fim de se verificar a eficiência da transferência.

A pesquisa por uma proteína embrionária pela técnica de *western blotting* foi realizada somente utilizando-se anticorpos anti-PLAP, haja vista a baixa positividade das reações imunohistoquímicas para CD30.

As membranas foram então incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS) durante duas horas à temperatura ambiente e em seguida, incubadas com o anticorpo primário (anticorpo de camundongo anti-PLAP de duas empresas diferentes, embora sejam do mesmo clone) a uma diluição de 1:100, *overnight* a 4° C.

As membranas foram novamente lavadas em solução de bloqueio (três vezes de 10 minutos cada) e incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo de ovelha anti-camundongo conjugado à HRP) a uma diluição de 1:2000 durante duas horas, à temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas em solução de bloqueio (três vezes de 10 minutos) e em solução de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS) por 10 minutos.

Todas as incubações e lavagens foram executadas sob agitação constante.

Após a última lavagem as membranas foram transferidas para PBS e transportadas até o local onde foram reveladas e incubadas em substrato quimioluminescente. As membranas foram submetidas à revelação em raio-X com o primeiro tempo de exposição de três minutos e os demais variando entre 15, 30 e 60 minutos, dependendo da intensidade dos sinais da primeira revelação.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNOHISTOQUÍMICA

A aplicação da técnica de IH no presente trabalho teve como objetivo mostrar a presença dos marcadores embrionários PLAP e CD30 nas amostras de tecido de TAC embebidas em blocos de parafina.

A fim de confirmar o estado de preservação dessas amostras, foram utilizados dois marcadores: p53 e 17-OHase, proteínas cuja presença é esperada em aproximadamente 90% e 100% das amostras, respectivamente. Esses valores se relacionam aos dados obtidos em análises de amostras de TAC de pacientes no estado do Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001) e na expressão restrita da enzima em tecidos esteroidogênicos, respectivamente.

Foram analisadas por IH um número variado de amostras para cada marcador: p53 em 59 amostras; 17-OHase em 40; PLAP em 47 e CD30 em 59. Essa variação é justificada pela diferença na quantidade de anticorpos disponíveis para os experimentos (tabela 3).

O resultado obtido para a pesquisa da proteína p53 foi seu acúmulo nos núcleos das células de 44 amostras de TAC, correspondendo a 75,9% das amostras analisadas. Essa expressão justifica-se pela presença da mutação R337H Tp53 em cerca de 90% dos TAC no estado do Paraná. A proteína normal, geralmente, não é detectada pela IH, pois possui um tempo de meia-vida muito curto (tabela 3).

A enzima 17-OHase, que exerce papel chave na biossíntese esteroidogênica, esteve presente em 65% (26/40) das amostras de TAC estudadas e nenhuma das amostras apresentando padrão focal de imunoreatividade. Dentre os tumores em estudo, dois podem ser classificados como “não funcionantes” e, entretanto era esperado que essas amostras também apresentassem imunoreatividade para a enzima em questão.

A isoenzima PLAP, presente em células de alguns tipos tumorais, especialmente seminomas, um tumor cujo tecido original é esteroidogênico, mostrou-

se presente em 17 das 47 amostras (36,2%). Em nenhuma das amostras de tecido adrenocortical normal analisadas essa proteína esteve presente (tabela 3).

As análises de IH para CD30 detectaram sua presença em 3 das 59 amostras estudadas, representado 5,1% de positividade (tabela 3).

Os padrões de imunorreatividade para IH considerados nesse trabalho foram positivo, negativo e focal, conforme ilustração na figura 6.

TABELA 3 - RESULTADOS DAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Marcador	Positivo	Negativo	Focal	Total de Amostras
Aumento nuclear de p53	44 (75,9%)	11 (18,9%)	3 (5,2%)	58 (100,0%)
17-OHase	26 (65,0%)	14 (35,0%)	0	40 (100,0%)
Presença de PLAP	17 (36,2%)	26 (55,3%)	4 (8,5%)	47 (100,0%)
Presença de CD 30	3 (5,1%)	52 (88,1%)	4 (6,8%)	59 (100,0%)

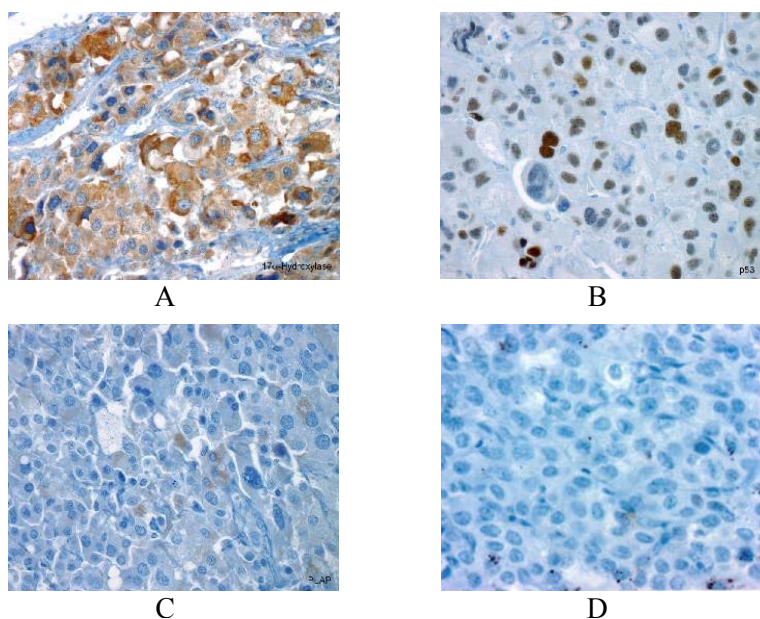
NOTA: A desigualdade no número total de amostras para os quatro marcadores é justificada pela limitação na quantidade de anticorpo disponível.

5.2 PESQUISA DO ALELO R337H TP53

A busca pelo alelo *Tp53* mutante (R337H) foi realizada por meio da extração de DNA genômico de leucócitos de pacientes com TAC, com posterior amplificação e digestão com endonuclease de restrição específica para clivagem no ponto da mutação em questão (exon 10, códon 337 de *Tp53*), permitindo que apenas o alelo normal seja clivado.

Dentre as 40 amostras analisadas por esse procedimento, foi detectada a presença do alelo mutante em 92,5% das amostras. Embora seja uma técnica bem mais sensível e específica que a IH, esse dado permite supor que os resultados encontrados para o acúmulo nuclear da proteína p53 em amostras de TAC embebido em parafina pela IH (75,9) estão subestimados (tabela 4).

FIGURA 6 - PADRÕES DE IMUNORREATIVIDADES
OBTIDOS NA IMUNOHISTOQUÍMICA



NOTA: Em aumento de 400x, imunorreatividades positivas em amostras de tecido de TAC embebidos em parafina, para as seguintes proteínas: em A: 17-OHase; em B: p53 (em excesso no núcleo das células); em C: PLAP. Em D: ausência de reatividade para CD30

TABELA 4 - RESULTADOS DA IH PARA P53 CONFIRMADOS
POR PCR

Técnica	Positivo	Negativo	Total de amostras
IH	44 (75,9)	11 (18,9%)	58 (100,0%)
PCR	37 (92,5%)	3 (7,5%)	40 (100,0%)

NOTA: A pesquisa do alelo R337H *Tp53* em algumas amostras de TAC teve como objetivo confirmar os resultados obtidos pela IH. Analisando os resultados verifica-se uma menor taxa de positividade para p53 nas amostras analisadas pela IH.

5.3 SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

No total foram analisadas cinco amostras congeladas de TAC por SDS-PAGE e *western blotting*. Utilizaram-se como controles positivos um padrão comercial de PLAP e uma amostra de placenta humana a termo, e como controle negativo, amostra de tecido de adrenal sem tumor.

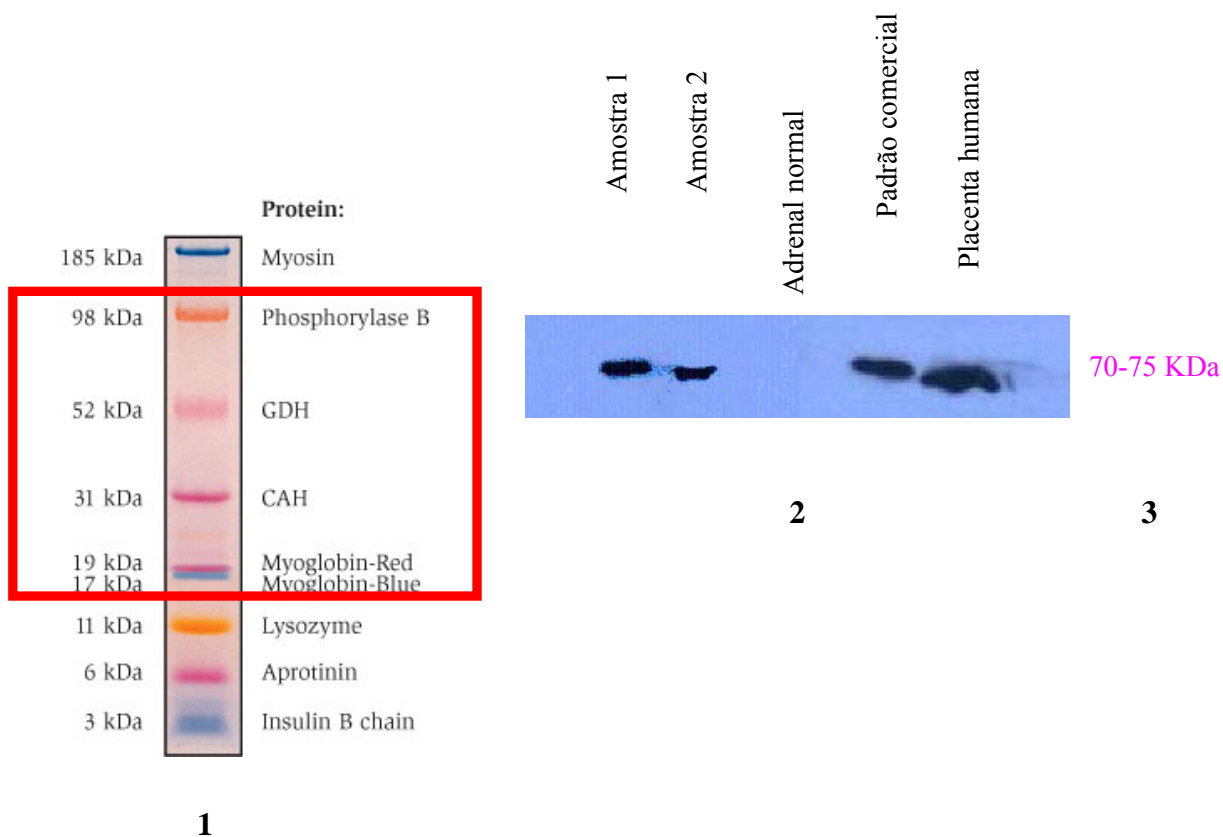
Investigou-se se dentre as proteínas presentes nas amostras de TAC em estudo encontrava-se também a isoenzima PLAP, pois o marcador CD30 apresentou-se com baixa frequência (5,1%) no TAC pela IH.

Para a análise por *western blotting* foram utilizados dois anticorpos anti-PLAP provenientes de empresas diferentes, embora fossem um mesmo clone. Observou-se então que não houve diferença na detecção da proteína por esses dois anticorpos.

A análise de TAC por *western blotting* permitiu detectar a presença de PLAP em duas das cinco amostras estudadas (figura 7). A utilização de um marcador de peso molecular correndo junto às amostras possibilitou uma estimação do peso molecular de PLAP encontrada tanto no tecido tumoral quanto na placenta, estando entre 70-75 KDa (figura 7). Os valores apresentados na literatura para seu peso estão na faixa entre 58 e 74 KDa (GOTTLIEB; SUSSMAN, 1968; STIGBRAND; FISHMAN, 1984b; EZRA et al., 1983; ITO; CHOU, 1983; NOURI et al., 2000; ERIKSSON et al., 2001; LE DU et al., 2001; LETHO; SHAROM, 2002).

Embora tenha sido possível a detecção de PLAP em duas amostras, devido à reduzida amostragem, não se pode determinar a frequência de positividade dessa proteína em TAC, bem como a identificação de amostras verdadeiramente negativas para esse marcador.

FIGURA 7 - RESULTADOS POSITIVOS PARA A PESQUISA DE PLAP EM AMOSTRAS DE TAC PELAS TÉCNICAS DE SDS-PAGE E *WESTERN BLOTTING*



NOTA: Esquema representando (1) a região do gel de poliacrilamida que foi cortado para prosseguir à transferência para a membrana de nitrocelulose (retângulo vermelho); (2) as bandas reveladas em raio-X após incubação com anticorpo anti-PLAP e (3) o peso molecular aproximado das mesmas.

6 DISCUSSÃO

Duas técnicas, IH e *western blotting*, foram empregadas neste estudo para identificar o marcador PLAP, e a positividade encontrada sugere fortemente que pelo menos uma parte dos TAC é de origem embrionária.

Ambas técnicas são amplamente utilizadas e oferecem informações complementares. A IH com microscopia de luz nos permite localizar o sinal de coloração de PLAP no de citoplasma e ausência no núcleo celular PLAP se localiza predominantemente na porção extracelular, ancorada na parte externa da membrana (McCOVILLE, FERGUNSON, 1993; HOOPER, 1997; FERGUNSON, 1999; ZHOU et al., 2001), como foi ilustrado na figura 4. Ao passo que o *western blotting* confirmou o peso molecular, mostrando o que já era esperado para PLAP, cada monômero em torno de 70-75 kDa. Esse valor é próximo aos descritos por NEUWALD E BROOKS (1981); NOURI *et al.* (2000) e LETHO E SHAROM (2002).

Na literatura é descrita uma extensa faixa de peso molecular para os monômeros de PLAP, entre 58 e 74 KDa (GOTTLIEB, SUSSMAN, 1968; STIGBRAND, FISHMAN, 1984b; EZRA *et al.*, 1983; ITO, CHOU, 1983; ERIKSSON *et al.*, 2001; LE DU *et al.*, 2001; LETHO, SHAROM, 2002). Essa variação pode ser explicada pela diferença no padrão de glicosilação de PLAP (ERIKSSON *et al.* 2001), o que ocasiona uma variabilidade fenotípica comum a outras glicoproteínas (RATHNAM, SAXENA, 1971; ALPERT *et al.*, 1972).

Vários fatores podem interferir nos resultados de técnicas que utilizam anticorpos, o que torna passível existirem resultados falsos positivos ou falsos negativos, especialmente, quando o anticorpo não é específico. Os anticorpos empregados neste estudo tiveram boa sensibilidade e excelente especificidade relatadas em outros trabalhos (DURBIN et al., 1988; RIBEIRO et al., 2001; KEMP, et al., 2002).

Outro aspecto importante que influencia nos resultados é o estado de preservação do marcador e seus epitopos. Por esta razão foi introduzido outro parâmetro de preservação do tecido tumoral através da imunoreatividade obtida para

proteína 17-OHase. Essa enzima faz parte da cascata de reações necessárias à produção de hormônios esteróides e é sintetizada somente pelas gônadas e pela glândula adrenal. A identificação de 17-OHase nas amostras de TAC tem como objetivo demonstrar que se trata de tecido esteroideogênico e também revelar seu grau de positividade em relação ao esperado (100%). Esta proteína deveria estar presente em todas as amostras analisadas por IH que produziram *in vivo* glicocorticóides e/ou andrógenos. O que deixou de ser revelado como positivo para 17-OHase, a diferença entre o esperado (100%) e o encontrado (65%), pode ser atribuída a uma inadequação na fixação ou preparação da amostra para o ensaio de IH.

Grande parte do material analisado na IH já fazia parte do arquivo de blocos de parafina do Hospital de Clínicas, portanto, pode ter ocorrido demora na fixação ou alteração na solução de fixação do tecido; nas etapas de pré-incubação, incubação e pós-incubação com os anticorpos, e finalmente, na reação catalisada pela peroxidase sobre o substrato DAB. Geralmente, o patologista seleciona a parte da peça tumoral sem necrose, entretanto, resta a dúvida se o corte é íntegro em sua totalidade.

Uma coloração que aparece focal quando deveria ser difusa, geralmente é em razão dos problemas de imunoreatividade com as áreas que aparecem negativas. Baseado nesta avaliação, a parte correspondente ao falso negativo de 17-OHase, aproximadamente 35%, representa o percentual de falha que pode acontecer com qualquer outra proteína, especialmente se a quantidade dessa for inferior a de 17-OHase, como PLAP.

No presente trabalho a concentração de PLAP em TAC foi estimada por meio da comparação com um tecido rico em PLAP (placenta), ou seja, comparação entre as intensidades dos sinais revelados no filme, sugerindo que a concentração é cerca de 50 a 100 vezes maior na placenta (controle positivo) do que em TAC. Tal dado sugere que o fato da expressão de PLAP ser baixa em TAC, pode levar a resultados negativos tanto pela IH quanto pelo *western blotting*, especialmente quando existe falhas na conservação ou preparação da amostra.

A positividade para PLAP na IH coloca em evidência três questões. A primeira seria a possibilidade de se tratar de falso positivo, devido à imunoreatividade

cruzada com o tipo PLAP-*like*. Empregaram-se nesse trabalho três anticorpos anti-PLAP (um para IH e dois para *western blotting*) procedentes de empresas diferentes, embora, como a grande maioria dos anticorpos anti-PLAP, apresentam imunoreatividade cruzada para PLAP e PLAP-*like*. A possibilidade de existir reatividade cruzada com outras proteínas é pouco provável.

A isoenzima chamada PLAP-*like* possui 98% de homologia com o gene da PLAP (MILLÁN; MANES; 1988) por isso é tão difícil discriminá-las utilizando apenas imunotestes (IH e *western blotting*). OTTO *et al.* (1995) descreveram um processo de separação dessas duas isoenzimas, que consiste em uma purificação prévia de “PLAPs” e uma associação de eletroforese bidimensional e imobilização em coluna com gradiente de pH. Ambas enzimas são úteis como marcadores para alguns tipos tumorais. PLAP-*like* e PLAP já foram descritas presentes em células de tumores esteroidogênicos, como os de ovários (LOWE; STRAUSS, 1990) e seminomas (KOSHIDA; WAHREN, 1990).

Possíveis reações cruzadas que tenham ocorrido nas análises de TAC, tanto na IH quanto no *western blotting*, não são relevantes para o presente estudo, pois como relatado anteriormente, tanto PLAP como PLAP-*like* são encontradas em tumores esteroidogênicos, bem como em placentas.

A segunda questão relacionada com a positividade de PLAP na IH (apenas em 36,2% das amostras investigadas) é que esta frequência de positividade em TAC seja mais elevada. Essa observação deve-se a possível existência de amostras mal preservadas, sugerida pelos valores abaixo do esperado para as proteínas 17-OHase e p53 que foram encontrados em algumas amostras de TAC.

A terceira questão é a mais difícil de ser avaliada e se constitui objetivo de outro estudo: saber quais os TAC realmente são negativos para PLAP. Para responder esta pergunta, o tecido tumoral deverá ser rapidamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise por *western blotting* ou fixado, em paraformaldeído/solução tamponada para IH em estudos prospectivos. Nestas condições se poderá subdividir os tumores em positivo ou negativo para PLAP, e

posteriormente, relacionar esses dados com as demais características clínicas, laboratoriais e histológicas, faixa etária e prognóstico dos pacientes.

Outro marcador pesquisado nas amostras de TAC pela IH foi o CD 30. Apenas 5,1% (3/59) das amostras apresentaram imunoreatividade positiva para esse marcador, portanto, pode-se sugerir que CD 30 não é útil na identificação das células de TAC.

O achado mais importante deste estudo foi saber que a expressão de PLAP em TAC pode significar, muito provavelmente, que o subtipo de tumor adrenocortical mais frequentemente encontrado em crianças é de origem embrionária. Este dado poderá contribuir também com testes que objetivem rastrear possíveis recidivas, especialmente aqueles do tipo ELISA para PLAP solúvel. Essa proteína sob a forma solúvel pode ser encontrada em amostras de soro e fluidos corporais de pacientes com alguns tumores.

A determinação plasmática de PLAP, em pacientes com outros tipos de tumores originários de tecidos esteroideogênicos, é útil tanto como auxiliar no diagnóstico, como no monitoramento da terapêutica. MANO *et al.* (1986) mostraram que a grande maioria das células de tumores de ovários expressa PLAP em alguma quantidade e há registrado na literatura um caso em que os níveis séricos de PLAP apresentaram-se elevados dois anos antes do diagnóstico de câncer de ovário (BEM-ARIE *et al.*, 1999). Pacientes com seminoma também possuem níveis elevados de PLAP no sangue (LANGE *et al.*, 1882; KOSHIDA *et al.*, 1996; NOURI *et al.*, 2000).

Alguns tumores de testículo expressam um tipo de PLAP que não se apresenta sob a forma solúvel e esse achado está sendo útil na diferenciação desses tumores e pode explicar a diferença na resposta clínica dos tumores de testículos ao tratamento (TELFER; GREEN, 1993; OLIVER, 1998).

Com os dados obtidos nesse trabalho, surge a hipótese de que a maior parte dos tumores adrenocorticais em crianças seja positiva para PLAP, enquanto apenas uma minoria dos encontrados em adultos seja positiva. NATHANSON E FISHMAN, (1971) foram os primeiros a publicar sobre a presença de PLAP em tumor de córtex adrenal. Nesse trabalho foram analisadas amostras de sangue de três pacientes com tumor de córtex adrenal e constatou-se que um paciente (33,3%) apresentou atividade

de fosfatase alcalina após aquecimento a 65° por 5 minutos. O método utilizado nesse estudo não é o mais indicado para esse tipo de análise e sua sensibilidade e especificidade são inferiores às das duas metodologias empregadas no presente estudo: IH e western blotting. Outra observação que deve ser feita sobre o trabalho de NATHANSON E FISHMAN (1971) é que não foram discriminadas as idades dos três pacientes com tumor de córtex adrenal. Somente é informado que os 253 pacientes que participaram do estudo apresentavam idade entre 1 e 92 anos, com média de 60 anos. Tendo-se como referência a presença de PLAP em amostras de tumor de córtex adrenal de crianças analisadas por IH e *western blotting* e o fato de que, muito provavelmente esse tipo tumoral se origina de forma diferenciada em crianças e adultos, pode-se sugerir que o paciente cuja amostra foi positiva para PLAP, no trabalho publicado por NATHANSON E FISHMAN (1971), trata-se de uma criança.

Dentre as amostras de TAC positivas para R337H *Tp53* (37/40; 92,5%) identificadas pelo teste de PCR e digestão pela enzima de restrição, *HhaI*, apenas 75,9% foram positivas para IH de p53. Esse dado reforça o argumento de falso negativo obtido com o estudo de blocos de parafina dos arquivos do Hospital de Clínicas em Curitiba.

Nos levantamentos dos casos de TAC que afirmam incidência elevada desse tumor na população pediátrica do Paraná, não foram encontradas evidências de aumento na incidência de outros tipos de tumores (SANDRINI *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2001). A condição de risco muito mais elevado ou exclusivo para o tecido do córtex adrenal fetal com a mutação germinativa R337H *Tp53*, se torna mais clara com a demonstração de tumores positivos para PLAP. O córtex adrenal fetal desprovido do efeito inibidor de proliferação celular ou da perda do poder de induzir a morte celular, quando perde o alelo normal e fica apenas com o mutante R337H *Tp53*, menos funcional em pH proporcionalmente mais alcalino e/ou temperaturas supra-fisiológicas (quadro 2), permite o surgimento de célula cancerosa (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002; HAINAUT, 2002) que mantém a expressão de PLAP. Isto acontece com maior frequência durante o período em que é mais intensa a proliferação celular e

deveria haver morte celular fisiológica e de células cancerosas, no último trimestre da gestação.

QUADRO 2 - RELAÇÃO PH, TEMPERATURA, ESTRUTURA E ATIVAÇÃO DE P53

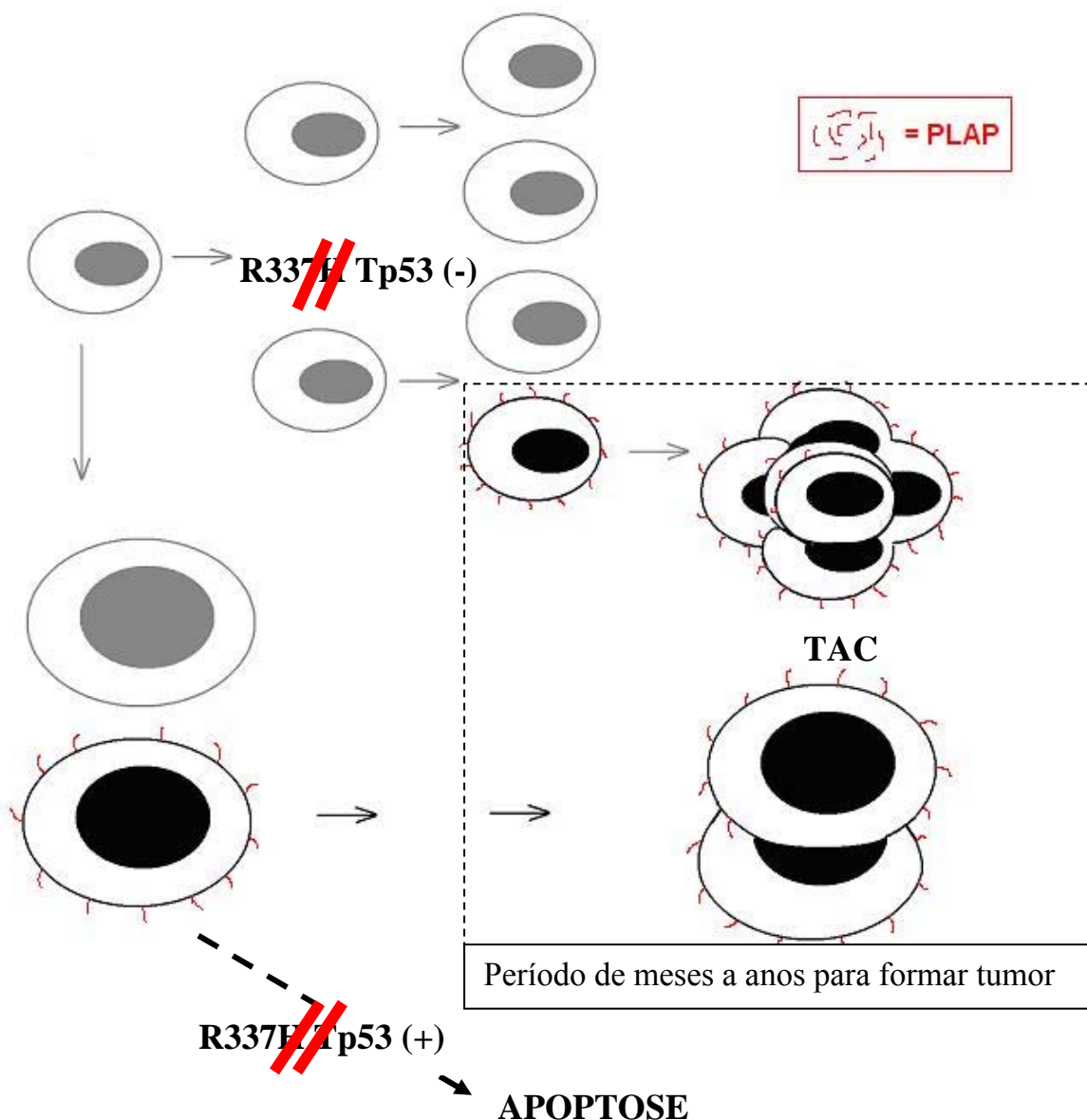
pH alcalino e/ou $T \geq 36,5^{\circ} \text{C}$	=	R337H p53 monomérico/dimérico	=	P53 inativo
pH < 7.0 e/ou $T < 36,5^{\circ} \text{C}$	=	R337H p53 tetramérico	=	P53 ativo

FONTE: DIGIAMMARINO *et al.*, 2002; HAINAUT, 2002

Com os resultados obtidos nesse trabalho é possível compreender um pouco mais sobre a biologia do TAC e propor sua origem embrionária (figura 8). Após a instalação das condições adequadas ao surgimento da célula cancerosa esta pode ser eliminada ou poderá se proliferar com velocidade variável. As células de TAC crescem até formar uma massa capaz de iniciar uma produção hormonal, dentro de meses ou anos, ou crescem formando grandes massas sem aumento na produção hormonal (tumores “não funcionantes”).

A confirmação de PLAP em TAC poderá colaborar como auxiliar na elaboração de um protocolo para determinação sérica de PLAP, útil para diagnóstico de possíveis recidivas e para acompanhamento da terapia antineoplásica.

FIGURA 8 - PROPOSTA PARA A ORIGEM EMBRIONÁRIA DO TAC



NOTA: Durante a fase embrionária, a partir de uma célula adrenocortical normal, perde-se o alelo normal de *Tp53* e o mutante R337H *Tp53* que permanece deixa de ser inibitório (-) da proliferação e não mais estimula (+) a apoptose em pH alcalino e temperatura supra-fisiológica. Em função de uma destas ou de ambas as deficiências, surge no período embrionário uma célula cancerosa que expressa PLAP, da zona fetal hipertrofiada ou das demais camadas do córtex adrenal. A primeira célula cancerosa pode levar meses ou anos para formar uma massa. O diagnóstico do TAC vai depender de uma série de fatores, principalmente da capacidade de hiperprodução hormonal com manifestação clínica.

7 CONCLUSÕES

1. CD30 é um marcador embrionário que se expressa com pouca frequência (5,1%) em TAC analisados por imunohistoquímica em corte de parafina.
2. PLAP está presente em parte (36,2%) dos TAC analisados, indicando que o sub-tipo de tumor adrenocortical estudado é de origem embrionária.

REFERÊNCIAS

ABELEV, G. Alpha-fetoprotein in oncogenesis and its association with malignant tumors. **Advan Cancer Res**, v.14, p.295-358, 1971.

ALPERT, E.; DRYSDALE, J. W.; ISSELBACHER, K. J. *et al.* Human -fetoprotein. Isolation, characterization, and demonstration of microheterogeneity. **J Biol Chem**, v.247, p.3792-3798, 1972.

ANDERSON, N. L.; NANCE, S. L.; PEARSON, T. W. *et al.* Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands. **Electrophoresis**, v.3, p.135-142, 1982.

ARNHEIM, N.; SOUTHERN, E. M. Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men. **Cell**, v.11, p.363-370, 1977.

BATTIFORA, H. Immunocytochemistry of hormone receptors in routinely processed tissues. The new gold standard **Appl Immunohistochem**, v. 2, p.143, 1994.

BELL, M. L.; ENGVALL, E. The specific detection of collagenous proteins after electrophoresis using enzyme-conjugated collagen-binding fibronectin fragments. **Anal Biochem**, v.123, p.329-335, 1982.

BERATIS, N. G.; SEEGRES, W.; HISRCHHORN, K. Properties of placental alkaline phosphatase. II. Interactions of fast-and slow-migrating components. **Biochem Genet**, v.5, p.367-377, 1971.

BERGENSTAL D. M.; HERTZ, R.; LIPSETT, M. B.; MOY, R. H. Chemotherapy of adrenocortical cancer with *o,p'*-DDD. **Ann Inter Med**, v.53, p. 672-682, 1960.

BERNSTEIN, L; GURNEY, J. G. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: RIES L. A. G.; SMITH, M. A.; GURNEY, J. G. *et al.* (Ed.). **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States: SEER program 1975-1995**. Bethesda, MD, National Cancer Institute, SEER Program, 1999, p. 139-147

BEUSCHLEIN, F.; REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. D.; JAURSCHANCKE, C.; ABDELHAMID, S.; CHOROUSOS, G. P.; ALLOLIO, B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasm. **Cancer Res**, v.54, p.4927-4932, 1994.

BIASON, A.; MANTERO, F.; SCARONI, C. *et al.* Deletion within the CYP17-gene together with insertion of foreign DNA is the cause of combined complete 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency in an Italian patient. **Molec Endocr**, v.43, p.2037-2041, 1992.

BIRCH, J. M.; BLAIR, V. Increase in childhood carcinomas in north-west England [Letter]. **Lancet**, v.1, p.833, 1988.

BIRCH, J. M.; BLAIR, V.; KELSEY, A. M.; EVANS, D. G.; HARRIS, M.; TRICKER, K.; VARLEY, J. M. Cancer phenotype correlates with constitutional *TP53* genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. **Oncogene**, v.17, p.1061-1068, 1998.

BITTNER, M.; KUPFERER, P.; MORRIS, C. F. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. **Anal Biochem**, v.102, p.459-471, 1980.

BOWEN, B.; STEINBERG, J.; LAEMMLI, U. K. *et al.* The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.1-20, 1980.

BOWEN, M. A.; LEE, R. K.; MIRAGLIOTA, G. *et al.* Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. **J Immunol**, v.156, p.442-449, 1996.

BRAUNSTEIN, G. D.; VAITUKAITIS, J. L.; CARBONE, P. P. *et al.* Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. **Ann Internal Med**, v.78, p.39-45, 1973.

BRENNAN, M. F. Adrenocortical carcinoma, CA. **Cancer J Clin**, v.37, p.348-365, 1987.

BRIERS, T. W.; NOUWEN, E. J.; POLLET, D. E. *et al.* Placentaire alkalische fosfatase als Tumormarker. **Revue de l'association Belge des technologies de laboratoire**, v.13, p.127-141, 1986.

BROE, M. E. DE, NOUVEN, E. J., POLLET, D. E. Human placental alkaline phosphatase as a tumor marker. **Adv Clin Enzymol**, v.3, p.39-52, 1986.

BROWN, D. A., LONDON, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. **J Biol Chem**, v.275, p.17221-17224, 2000.

BUGG, M. F.; RIBEIRO, R. C.; ROBERSON, P. K. *et al.* Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. **Am J Clin Pathol**, v.101, p.625-629, 1994.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem**, v.112, p.195-203, 1981.

BUTIKOFER, P., VASSELLA, E., RUEPP, S. *et al.* Phosphorylation of a major GPI-anchored surface protein of *Trypanosoma brucei* during transport to the plasma membrane. **J Cell Sci**, v.112, p.1785-1795, 1999.

CARTUN, R. W.; PEDERSEN, C. A. An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. **J Histotechnol**, v.12, p.273, 1989.

CHAN, J. R., STINSON, R. A. Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, v.261, p.7635-7639, 1986.

CHUDLER, R. M.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. **Urol Clin North Am**, v.16, p.469-479, 1989.

CHUNG, B. C.; PICADO-LEONARD, J.; HANIU, M. *et al.* Cytochrome P450c17 (steroid 17-hydroxylase/17,20-lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, p.407-411, 1987.

CONNOLLY, J. L.; SCHNITT, S. J.; WANG, H. H. *et al.* Principles of Cancer Pathology: Role of the Immunohistochemist. In: Bast, R. C.; Kufe, d. W.; Pollock, r. E. *et al.*(Ed.). **Cancer Medicine**. 5 ed. Canadá: BC Decker Inc., 2000. Disponível em <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=cancer%20medicine%20AND%20immunohistochemistry%20AND%2017149\[uid\]&rid=cmed.chapter.6534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=cancer%20medicine%20AND%20immunohistochemistry%20AND%2017149[uid]&rid=cmed.chapter.6534)> Acesso em 10 nov. 2003.

CROOTE, G DE, WAELE, P DE, VAN DER VOODRE, A *et al.* Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. **Clin Chem**, v.29, p.115-119, 1983.

CRUMP INSTITUTE FOR BIOLOGICAL IMAGING, UCLA. **Nuclear Medicine Mediabook**. Disponível em: <http://www.crump.ucla.edu:8801/nm-Mediabook/TCL_files/topic.asp?topic_id=1158&system_id=403> Acesso em 04 dez. 2003.

DABARE, A. A., NOURI, A. M., CANNEL, H. *et al.* Profile of placental alkaline phosphatase expression in human malignancies: effect of tumour cell activation on alkaline phosphatase expression. **Urol Int**, v.63, p.168-174, 1999.

DAMLE, S. R., SHEETY, P. A., JUSSAWALLA, D. J. *et al.* Occurrence of heat-stable Regan type of alkaline phosphatase in hematopoietic tumors. **Int J Cancer**, v.24, p.398-401, 1979.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II: method and application to human serum proteins. **Ann N Y Acad Sci**, v.121, p.404-427, 1964.

DE GROOTE, G.; DE WAELE, P.; VAN DER VOORDE A. *et al.* Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. **Clin Chem**, v.29, p.115-119, 1983.

DEBORE, M. E., POLLET, D. E. Multicenter evatuation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. **Clin Chem**, v.34, p.1995-1999, 1988.

DELMAS, V., VAN DER HOORN, F., MELLSTROM, B., *et al.* Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. **Mol Endocrinol**, v.7, n.11, p.1502-14, 1993.

DIGIAMMARINO, E. L.; LEE, A. S.; CADWELL, C.; ZHANG, W.; BOTHER, B.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G.; KRIWACKI, R. W. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, v.9, n.1, p.12-6, 2002.

DOELLGAST, G. H., FISHMAN, W. H. L-Leucine, a specific inhibitor of a rate human placental alkaline phosphatase phenotype. **Nature (London)**, v.259, p.49-51, 1976.

DOELLGAST, G. H., SPIEGEL, J.; GUENTHER, R. A. *et al.* Studies on human placental alkaline phosphatase. Purification by immunoabsorption and comparison of the “A” e “B” forms of the enzyme. **Biochem Biophys Acta**, v.484, p.59-78, 1977.

DOELLGAST, G. J. An hypothesis on the evolution of human placental alkaline phosphatase. **Prog Clin Biol Res**, v.166, p.25-46, 1984.

DOELLGAST, G. J., BENIRSCHKE, K. Placental alkaline phosphatase in Hominidae. **Nature**, v.280, p.601-602, 1979.

DURBIN, H.; TUCKER, D. F.; MILLIGAN, E. M. *et al.* Production of monoclonal antibodies to placental alkaline phosphatase: preliminary characterisation includes identification of one antibody reactive with routinely fixed histological preparations. **Int J Cancer**, suppl.2, p.50-58, 1988.

DÜRKOP, H.; FOSS, H. D.; EITELBACH, F. *et al.* Expression of CD30 antigen in non-lymphoid tissues and cells. **J Pathol**, v.190, p.613-618, 2000.

DÜRKOP, H.; LATZA, U.; HUMMEL, M. *et al.* Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. **Cell**, v.68, p.421-427, 1992.

EERDEKENS, M. W., NOUVEN, E. J., DAUWE, S. E., BROE, M. E. Detection and immunohistochemical localization of HPLAP and CA 125 in sera and tissues of patients with ovarian, non-ovarian tumors, and liver disorders. **Proc Protides Biol Fluids**, v.33, p.683-686, 1985.

EISENHABER, B.; BORK, P.; EISENHABER, F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. **Protein Eng**, v.14, p.17-25, 2001.

ELLIS, T. M.; SIMMS, P.E.; SLIVNICK, D. J.; *et al.* CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. **J Immunol**, v.151, p.2380-2389, 1993.

ENGERT, A.; MARTIN, G.; PFREUNDSCHUH, M. *et al.* Antitumor effects of ricin A chain immunotoxins prepared from intact antibodies and Fab' fragments on solid human Hodgkin's disease tumours in mice. **Cancer Res**, v.50, p.2929-2935, 1990.

ERICKSON, P. F.; MINIER, L. N.; LASHER, R. S. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens. **J Immunol Methods**, v.51, p.241-249, 1982.

ERIKSSON, H. J. C.; SOMSEN, G. W.; HINRICHS, W. L. J. *et al.* Characterization of human placental alkaline phosphatase by activity and protein assays, capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatography B**, v.755, p.311-319, 2001.

ERLICH, H. A.; LEVINSON, J. R.; COHEN, S. N. *et al.* Filter affinity transfer. A new technique for the in situ identification of proteins in gels. **J Biol Chem**, v.254, n.23, p.12240-12247, 1979.

EVANS, S. C.; LOZANO, G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. **Mol Med Today**, v. 3, p.390-395, 1997.

EZRA, E.; BLACHER, R.; UDENTFRIEND, S. Purification and partial sequencing of human placental alkaline phosphatase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.116, n.3, p.1076-1083, 1983.

FAIRBANKS, G.; STECK, T. L.; WALLACH, D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochem**, v.10, n.13, p.2606-2617, 1971.

FALINI, B.; PILERI, S.; PIZZOLO, G. *et al.* CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. **Blood**, v.85, p.1-14, 1995.

FANG, V. S. Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture. **Cancer Res**, v. 39, n.1, p.139-45, 1979.

FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J Cell Sci**, v.112, p.2799-2809, 1999.

FERGUSON, M. A. J.; WILLIAMS, A. F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. **Annu Rev Biochem**, v.57, p.285-320, 1988.

FERNANDEZ-POL, J. A. Immunoautoradiographic detection of epidermal growth factor receptors after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper. **FEBS Lett**, v.143, n.1, p.86-92, 1982.

FIGUEIREDO, B. C.; MOURA, J. F. Fisiologia da córtex adrenal humana. In: FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; LACERDA, L. de. (Ed.). **Tumores de Córtex Adrenal: Fisiologia, Clínica, Epidemiologia, Patologia, Genética e Tratamento**, Curitiba: Serviço de Informática da Educação, UFPR, 2003. 1 CD-ROM

FIGUEIREDO, B. C.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G. *et al.* Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.10, p.1217-1224, 2000.

FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; PEREIRA, R. M. *et al.* Adrenocortical cancer predisposition associated with a low penetrance *Tp53* 337H allele in southern Brazil, no prelo.

FIGUEIREDO, B. C.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.3, p.1116-1121, 1999.

FIGUEIREDO, B.C.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G. *et al.* Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: one specific feature unrelated to ethnic neither living conditions. **Braz J Med Biol Res**, v.33, p.1217-1224, 2000.

FISHMAN, L., MIYAYAMA, H., DRISCOLL, S. G. *et al.* Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzyme of human placenta and occurrence in human cancer. **Cancer Res**, v.36, p.2269-2273, 1976.

FISHMAN, W. H. Oncotrophoblast gene expression: placental alkaline phosphatase. **Adv Cancer Res**, v.48, p.1-35, 1987.

FISHMAN, W. H. Perspective on alkaline phosphatase isoenzymes. **Amer J Med**, v.56, p.617-650, 1974.

FISHMAN, W. H., GHOSH, N. K., INGLIS, N. R. *et al.* Quantitation of placental isoenzyme of alkaline phosphatase in pregnancy sera. **Enzymologia**, v.34, p.317-321, 1968a.

FISHMAN, W. H., INGLIS, N. I., STOLBACH, L. I. *et al.* A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. **Cancer Res**, v.28, p.150-154, 1968b.

FONATSCH, C.; LATZA, U.; DÜRKOP, H. *et al.* Assignment of the human CD30 (Ki-1) gene to 1p36. **Genomics**, v.14, p.825-826, 1992.

FRANKE, W. W.; WINTER, S. GRUND, C. *et al.* Isolation and characterization of desmosome-associated tonofilaments from rat intestinal brush border. **J Cell Biol**, v.90, n.1, p.116-127, 1981.

GARCIA, R. L.; COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. **Am J Pathol**, v.134, p.733-739, 1989.

GERDES, J.; LELLE, R. J.; PICKARTZ, H. *et al.* Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. **J Clin Pathol**, v.39, p.977-980, 1986.

GERLI, R.; PITZALIS, C.; BISTONI, O. *et al.* CD30+ T cells in rheumatoid synovitis: mechanisms of recruitment and functional role. **J Immunol**, v. 164, p.4399-4407, 2000.

GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. **Anal Biochem**, v.124, n.2, p.396-405, 1982(a).

GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. **Anal Biochem**, v.124, n.2, p.396-405, 1982(b).

GERSHONI, J. M.; PALADE, G. E. Protein blotting – Principles and Applications. **Anal Biochem**, v.131, p.1-15, 1983.

GHOSH, N. K.; FISHMAN, W. H. Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.108, p.779-792, 1968.

GILFILLAN, M. C.; NOEL, P. J.; PODACK, E. R. *et al.* Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. **J Immunol**, v.160, 2180-2187, 1998.

GITLIN, D., KITZES, J., BOSEMAN, M. Cellular distribution of serum α -fetoproteins in organs of the fetal rat. **Nature**, v.215, p.534, 1967.

GOLDSTEIN, D. J., HARRIS, H. Human placental alkaline phosphatase differs from that of other species. **Nature**, v.280, p.602-605, 1979.

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. Evolution of alkaline phosphatases in primates. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.79, n.3, p.879-883, 1982(a).

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.77, n.5, p.2875-2860, 1980.

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus. **Clin Chim Acta**, v.125, p.63-75, 1982(b).

GORELICK, F. S.; COHN, J. A.; FREEDMAN, S. D. *et al.* Calmodulin-stimulated protein kinase activity from rat pancreas. **J Cell Biol**, v.97, n.4, p.1294-1298, 1983.

GOTTLIEB, A. J.; SUSSMAN, H.H., Human placental alkaline phosphatase: molecular weight and subunit structure. **Biochem Biophys Acta**, v.160, n.2, p.167, 1968.

GREENE, P. J.; SUSSMAN, H. H. Structural comparison of ectopic and normal placental alkaline phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.70, n.10, p.2936, 1973.

GRIFFITH, O. H.; VOLWERK, J. J.; CUPE, A. Phosphatidylinositol-specific phospholipases C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Methods Enzymol**, v.197, p.493-502, 1991.

GULLICK, W. J.; LINDSTROM, J. M. Subunit composition of bovine muscle acetylcholine receptor. **Biochem**, v.21,n.21, p.4563-4569, 1982.

GURNEY, J. G.; SEVERSON, R.K.; DAVIS, S. *et al.* Incidence of cancer on children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer**, v.75, p.2186-2195, 1995.

HABUCHI, T.; DEVLIN, J.; ELDER, P. A. *et al.* Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. **Oncogene**, v.11, p.1671-1674, 1995.

HAINAUT, P. Tumor specific mutations in p53: The acid test. **Nature Medicine**, v.8, p.21-23, 2002.

HAMILTON-DUTOIT, S., LOU, H., PALLESEN, G. The expression of placental alkaline phosphatases (PLAP) and PLAP-like enzymes in normal and neoplastic human tissues. An immunohistological survey using monoclonal antibody. **APMIS**, v.98, p.797-811, 1990.

HANADA, K., NISHIJIMA, M., AKAMATSY, Y., AND PAGANO, R. E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. **J Biol Chem**, v.270, n.11, p.6254-6260, 1995.

HARMENBERG, U., FRODIN, J.E., LJUNGDAHL-STAHLE, E., *et al* Significance of alkaline phosphatase isozymes in the monitoring of patients with colorectal carcinoma. **Tumour Biol**, v.10, n.5, p.225-31, 1989.

HARRIS, H. Multilocus enzyme systems and the evolution of gene expression: the alkaline phosphatases as a model example. **Harvey Lect**, v.76, p.95-124, 1980-81.

HARRIS, H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. **Clin Chim Acta**, v.186, n.2, p.133-150, 1989.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A.; ROBSON, E. B. The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. **Ann Hum Genet**, v.37, n.3, p.237-253, 1974.

HART, M. M.; REAGAN, R. L.; ADAMSON, R. H. The effect of isomers of DDD on the ACTH-induced steroid output, histology and ultrastructure of the dog adrenal cortex. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.24, p.101-113, 1973.

HARTLEY, A. L.; BIRCH, J. M.; MARSDEN, H. B.; REID, H.; HARRIS, M.; BLAIR, V. Adrenal cortical tumours: epidemiological and familial aspects. **Arch Dis Child**, v. 62, p.683-689, 1987.

HAWROT, E.; GERSHONI, J. M.; BURRAGE, T. G. *et al.* **Abst Soc Neur**, v.8, p.335 (91.7), 1982.

HAYMAN, E. G.; ENGVALL, E.; A'HEARN, E. *et al.* Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. **J. Cell Biol**, v.95, n.1, p.20-23, 1982.

HENRY, I.; JEANPIERRE, M.; COULIN, P.; BARICHARD, F.; SERRE, J. L.; JOURNAL, H.; LAMOUREUX, A.; TURLEAU, C.; DEGROUCHY, J.; JUNIEN, C. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition of adrenocortical carcinoma. **Hum Genet**, v.81, p.273-277, 1989.

HENTHORN, P. S.; KNOLL, B. J.; RADUCHA, M. *et al.* Products of two common alleles at the locus for human placental alkaline phosphatase differ by seven amino acids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, n.15, p.5597-5601, 1986.

HIRANO, K.; MATSUMOTO, H.; TANAKA, T. *et al.* Specific assays for human alkaline phosphatase isoenzymes. **Clin Chim Acta**, v.166, p.263-273, 1987.

HITTMAIR, A.; ROGATSCH, H.; HOBISCH, A. *et al.* CD30 expression in seminoma. **Hum Pathol**, v.27, n.11, p.1166-1671, 1996.

HIWATASHI, A.; ICHIKAWA, Y. Physicochemical properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase from bovine adrenocortical microsomes. **Biochem Biophys Acta**, v.580, p.44-63, 1979.

HOCH, S.O. DNA-binding domains of fibronectin probed using Western blots. **Biochem Biophys Res Commun**, v.106, n.4, p.1353-1358, 1982.

HOGAN, T. F.; CITRIN, D. L.; JOHNSON, B. M.; NAKAMURA, S.; DAVIS, T. E.; BORDEN, E. C. o,p'-DDD (mitotane) therapy of adrenal cortical carcinoma. **Cancer**, v. 42, p.2177 -2181, 1978.

HOLLSTEIN, M.; SHOMER, B.; GREENBLATT, M. *et al.* Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. **Nucl Acids Res**, v.24, p.141-146, 1996.

HOOVER, N. M. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. **Clin Chim Acta**, v.266, n.1, p.3-12, 1997.

HORIE, R.; WATANABE, T. CD 30: expression and function in health and disease. **Immunol**, v.10, p.457-470, 1998.

HORNIGOLD, N.; DEVLIN, J.; DAVIS, A. M. *et al.* Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. **Oncogene**, v.18, p.2657-2661, 1999.

HOWE, J. G.; HERSHEY, J. W. B. A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor levels in lysates of Escherichia coli. **J Biol Chem**, v.256, n.24, p.12836-12839, 1981.

HOYLAERTS, M. F., MANES, T., MILLÁN, J. L. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.286, pt.1, p.23-30, 1992.

HUANG, K. S.; LI, S.; LOW, M. G. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. **Methods Enzymol**, v.197, p.567-575, 1991.

HUMMER, C., MILLÁN, J. L. Gly429 is the major determinant of uncompetitive inhibition of human germ cell alkaline phosphatase by L-leucine. **Biochem**, v.274, pt 1, p.91-95, 1991.

HUTTER, A. M. Jr.; KAUFMAN, D. E. Adrenal cortical carcinoma. **Am J Med**, v.4, p.576, 1966.

HUVOS A. G.; HAIDU, S. I.; BRASFIELD, R. D.; FOOTE, F. W. Jr. Adrenal cortical carcinoma. Clinicopathologic study of 34 cases. **Cancer**, v.25, p.354-361, 1970.

IKEZAWA, H; YAMANEGI, M; TAGUCHI, R. *et al.* Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. **Biochem Biophys Acta**, v.450, n.2, p.154-164, 1976.

ITO, F.; CHOU, J. Y. Biosynthesis and processing of placental alkaline phosphatase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.111, n.2, p.611-618, 1983.

ITO, K.; WATANABE, T.; HORIE, R. *et al.* High expression of the CD30 molecule in human decidual cells. **Am J Pathol**, v.145, p.276-280., 1994.

JACOB, B., BAGSHAWE, K. D. A radioimmunoassay for placental-like alkaline phosphatase. **Cancer Res**, v.32, p.2413-2420, 1972.

JAMES, L. A.; KELSEY, A. M.; BIRCH, J. M. *et al.* Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, v.81, p.300-304, 1999.

JEMMERSON, R.; SHAH, N.; TAKEYA, M *et al.* Characterization of the placental alkaline phosphatase-like (Nagao) isozyme on the surface of A431 human epidermoid carcinoma cells. **Cancer Res**, v.45, n.1, p.282-287, 1985.

JEMMERSON, R.; STIGBRAND, T. Monoclonal antibodies block the trypsin cleavage site on human placental alkaline phosphatase. **FEBS Lett**, v.173, n.2, p.357-359, 1984.

JOHNSON, P. M., BROWN, P. J., OGBIMI, A. O. *et al.* The human syncytiotrophoblast microvillous plasma membrane. In: Gkeicher, N., ed. **Reproductive immunology**, New York: Alan R. Liss Inc., p.77-91, 1981.

KAGIMOTO, K.; WATERMAN, M. R.; KAGIMOTO, M. *et al.* Identification of a common molecular basis for combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency in two Mennonite families. **Hum Genet**, v.82, p. 285-286, 1989.

KAGIMOTO, M.; WINTER, J. S. D.; KAGIMOTO, K. *et al.* Structural characterization of normal and mutant human steroid 17-hydroxylase genes: molecular basis of one example of combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency. **Molec Endocr**, v.2, p.564-570, 1988.

KAKITA, K.; O'CONNELL, K.; PERMUTT, M. A. Pancreatic content of insulins I and II in laboratory rodents. Analysis by immunoelectrophoresis. **Diabetes**, v.31, n.10, p.648-652, 1982.

KALTSCHMIDT, E.; WITTMAN, H. G. Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. **Anal Biochem**, v.36, n.2, p.401-412, 1970.

KAM, W.; CLAUSER, E.; KIM, Y. S. *et al.* Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.82, n. 24, p.8715-8719, 1985.

KAMINSKY, N.; LUSE, S.; HARTROFT, P. Ultrastructure of adrenal cortex of the dog during treatment with DDD. **J Natl Cancer Inst**, v.29, p.265-275, 1951.

KANG, J. O.; HUDAK, W. A.; CROWLEY, W. J. *et al.* Placental-type alkaline phosphatase in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Clin Chim Acta**, v.186, p.285-294, 1989.

KAUDEWITZ, P.; STEIN, H.; BURG, G. *et al.* Atypical cells in lymphomatoid papulosis express the Hodgkin cell-associated antigen Ki-1. **J. Investing Dermatol**, v. 86, p.350-354, 1986.

KAUFMANN, S. H.; EWING, C. M.; SHAPER, J. H. The Erasable Western Blot. **Anal Biochem**, v.161, p.89-95, 1987.

KEEGAN, C. E.; HAMMER, G. D. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab**, v.13, p.200-208, 2002.

KEMP, K.; KURTZHALS, J. A.; AKANMORI, B. D. *et al.* Increased levels of soluble CD30 in plasma of patients with *Plasmodium falciparum* malaria. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.3, p. 720-722, 2002.

KING, D. R.; LACK, E. E. Adrenal cortical carcinoma: a clinical and pathologic study of 49 cases. **Cancer**, v.44, p.239-244, 1979.

KJELLMAN, M.; KALLIONIEMI, O. P.; KARTHU, R. *et al.* Genetic aberrations in adrenocortical tumours detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. **Cancer Res**, v.56, p.4219-4223, 1996.

KLEIHUES P.; SCHAUBLE, P.; ZUR, H.; ESTEVE, J.; OHGAKI, H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. **Am J Pathol**, v.150, p.1-13, 1997.

KNOLL, B. J.; ROTHBLUM, K. N.; LONGLEY, M. A. Two gene duplication events in the evolution of the human heat-stable alkaline phosphatases. **Gene (Amst)**, v.60, n.2-3, p.267-276, 1987.

KNOLL, B. J.; ROTHBLUM, K. N.; LONGLEY, M. Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. **J Biol Chem**, v.263, p.12020-12027, 1988.

KOSHIDA, K., UCHIBAYASHI, T., YAMAMOTO, H., HIRANO, K. Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. **Br J Urol**, v.77, n.1, p.138-142, 1996.

KOSHIDA, K.; WAHREN, B. Placental-like alkaline phosphatase in seminoma. **Urol Res**, v.18, n.2, p.87-92, 1990.

KOSMAS, C., KALOFONOS, H., HIRD, V., EPENETOS, A. Monoclonal antibody targeting of ovarian carcinoma. **Oncology**, v.55, p.435-446, 1998.

KOYAMA, I.; STENDALH, U.; STIGBRAND, T. Placental-like alkaline phosphatase from ovary and ascites of a patient with a malignant ovary tumour. **Clin Chim Acta**, v.186, p.295-300, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LATRONICO, A. C.; CHROUSOS, G. P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, p.1317-1324, 1997.

LATZA, U.; FOSS, H. D.; DÜRKOP, H *et al.* CD30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of the soluble form. **Am J Pathol**, v.1456, p.463-471, 1995.

LE DU, M. H., STIBGBRAND, T., TAUSSIG, M. J., *et al.* Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å resolution. **J Biol Chem**, v.276, p.9158-9165, 2001.

LEE, C. Y.; HUANG, Y. S.; HU, P. C. *et al.* Analysis of sperm antigens by sodium dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunobinding method. **Anal. Biochem**, v.123, n.1, p.14-22, 1982.

LEFEVRE, M; GERARD-MARCHANDT, R.; GUBLER, J. P.; CHAUSSAIN, J. L.; LEMERLE, J. Adrenal cortical carcinoma in children: 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In: HUPHERY, G. B.; GRINDLEY, G. B; DEHNER, L. P. (Ed.), **Adrenal and Endocrine Neoplasia**, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, p.265-276, 1984.

LEGOCKI, R. P.; VERMA, D. P. S. Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. **Anal Biochem**, v.111, n.2, p.385-392, 1981.

LEHTO, M. T.; SHAROM, F. J. Proximity of the protein moiety of a GPI-Anchored protein to the membrane surface: a FRET study. **Biochem**, v.41, p.8368-8376, 2002.

LEHTO, M. T.; SHAROM, F. J. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. **Biochem J**, v.332, pt.1, p.101-109, 1998.

LIN, D.; HARIKRISHNA, J. A.; MOORE, C. C. D. *et al.* Missense mutation serine (106) proline causes 17-hydroxylase deficiency. **J Biol Chem**, v.266, p.15992-15998, 1991.

LIN, J.; TERESKY, A.K.; LEVINE, A. Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. **Oncogene**, v.10, p.2387-2390, 1995.

LIN, S. R.; LEE, Y. J.; TSAI, J. H. Mutations of p53 gene in human functional adrenal neoplasm. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, p.483-491, 1994.

LISANTI, M. P. *et al.* Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, n.24, p.9557-9561, 1988.

LOOSE, J. H.; DAMJANOV, I.; HARRIS, H. Identity of the neoplastic alkaline phosphatase as revealed with monoclonal antibodies to the placental form of the enzyme. **Am J Clin Pathol**, v.82, n.2, p.173-177, 1984.

LOW, M. G., FINEAN, J. B. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Biochem J**, v.167, n.1, p.281-284, 1977.

LOWE, M. E.; STRAUSS, A. W. Expression of Nagao-type, phosphatidylinositol-Glycan Anchored Alkaline Phosphatase in Human Choriocarcinomas. **Cancer Res**, v.50, p.3956-3962, 1990.

LUBITZ, J. A.; FREEMAN, L.; OKUN, R. Mitotane use in inoperable adrenocortical carcinoma. **JAMA**, v.223, p. 1109-1112, 1973.

MAKIYA, R., STIGBRAND, T. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Biochem Biophys Res Commun**, v.182, n.1, p.624-630, 1992b.

MAKIYA, R.; STIGBRAND, T. Placental alkaline phosphatase has a binding site for the human immunoglobulin-G Fc portion. **Eur J Biochem**, v.205, p.341-345, 1992a.

MALKIN, D.; LI, F. P.; STRONG, L. C.; FRAUMENI, J. F. JR; NELSON, C. E.; KIM, D. H.; KASSEL, J.; GRYKA, M. A.; BISCHOFF, F. Z.; TAINSKY, M. A. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and another neoplasm. **Science**, v.250, p.1233-1238, 1990.

MANO, H., FURUHASHI, Y., MORIKAWA, Y. *et al.* Radioimmunoassay of placental alkaline phosphatase in ovarian cancer sera and tissue. **Obstet Gynecol**, v.68, p.59-764, 1986.

MARIGO, C.; MULLER, H.; DAVIES, J. N. *et al.* Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. **J Natl Cancer Inst**, v.43, n.6, p.1231-1240, 1969.

MARTIN, D.; TUCKER, D. F.; GORMAN, P. *et al.* The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. **Ann Hum Genet**, v.51, pt.2, p.145-152, 1987.

MASLOW, W. C., MUENSCH, H. A., AZAMA, F *et al.* Sensitive fluorometry of heat stable alkaline phosphatase (Regan enzyme) in serum from smokers and non-smokers. **Clin Chem**, v.29, p.260-263, 1983.

MATTESON, K. J.; PICADO-LEONARD, J.; CHUNG, B. C. *et al.* Assignment of the gene for adrenal p45017 (steroid 17-hydroxylase/17,20-lyase) to human chromosome 10. **J Clin Endocr Metab**, v.63, p.789-791, 1986.

MAURI, F. A.; GIRLANDO, S.; DALLA PALMA, P. *et al.* Ki-67 antibodies (Ki-S5, MIB-1, and Ki-67) in breast carcinomas. A brief quantitative comparison. **Appl Immunohistochem**, v.2, p.171-176, 1994.

McCOMB, R. B.; BOWES, G. N. Jr.; POSEN, S. **Alkaline phosphatase**, (Plenum Publishing Corp, New York), 1979.

McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem J**, 294, 305-324. 1993.

McDICKEN, I. W., MCLAUGHLIN, R. J., TROMANS, P. M. *et al.* Detection of placental-type phosphatase in ovarian cancer. **Br J Cancer**, v.52, p.59-64, 1965.

MCLAUGHLIN, P. J., GEE, H., JOHNSON, P. M. Placental-type alkaline phosphatase in pregnancy and malignant plasma: specific estimation using a monoclonal antibody in solid phase enzyme immunoassay. **Clin Chem Acta**, v.130, p.199-206, 1983.

MCLAUGHLIN, P. J., JOHNSON, P. M. **A search for human placental-type alkaline phosphatases using monoclonal antibodies**, New York: Alan R. Liss Inc., p.67-75, 1984(a).

MCLAUGHLIN, P. J., TRAVERS, P., McDICKEN, I. W. *et al.* Demonstration of placental and placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissue extracts using monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Clin Chim Acta**, v.137, p.341-348, 1984(b).

McLAUGHLIN, P. J., TWIST, A. M., EVANS, C. C. *et al.* Serum placental-type alkaline phosphatase in cigarette smokers. **J Clin Pathol**, v.37, p.826-828, 1984(c).

McMICHAEL, J. C.; GREISIGER, L. M.; MILLMAN, I. The use of nitrocellulose blotting for the study of hepatitis B surface antigen electrophoresed in agarose gels. **J Immunol Methods**, v.45, n.1, p.75-94, 1981.

MECHTERSHEIMER, G.; MOLLER, P. Expression of Ki-1 antigen (CD30) in mesenchymal tumours. **Cancer**, v.66, p.1732-1737, 1990.

MESIANO, S; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endrocr Rev**, v.18, n.3, 378-403, 1997.

MESSER, R. H. Heat-stable alkaline phosphatase as an index of placental function. **Am J Obstet Gyn**, v.98, p.459-465, 1967.

METS, L. J.; BOGORAD, L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: an improved method for ribosomal proteins. **Anal Biochem**, v.57, n.1, p.200-210, 1974.

METZ, C. N. BRUNNER, G.; CHOI-MUIRA, N. H.; *et al.* Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. **EMBO J**, v.13, n. 7, p.1741-1751, 1994.

MICHALKIEWICZ E, SANDRINI R, FIGUEIREDO B, C. *et al.* Clinical and Outcome Characteristics of Children with Adrenocortical Tumors. An Analysis of 254 Cases from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry **J Clin Oncol**, v.22, n.5, p.838-845, 2004.

MILLÁN, J. L. Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation. **Clin Chim Acta**, v.209, n.1-2, p.123-129, 1992.

MILLÁN, J. L. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, v.261, n.7, p.3112-3115, 1986.

MILLÁN, J. L. Oncodevelopmental expression and structure of alkaline phosphatase genes. **Anticancer Res**, v.8, 5A, p.995-1004, 1988.

MILLÁN, J. L., Eriksson, A., STIGBRAND, T. A possible new locus of alkaline phosphatase expressed in human testis. **Human Genet**, v.62, p.293-295, 1982.

MILLÁN, J. L., Fishman, W. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.32, p.1-39, 1995.

MILLER, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocr Rev**, v.9, p.295-318, 1988.

MOVAHEDI, S.; HOOPER, N. M. Insulin stimulates the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase from 3T3-L1 adipocytes through the action of a phospholipase C. **Biochem J**, v.326, p.531-537, 1997.

MUENSCH, H. A., MASLOW, W. C., AZAMA, F. *et al.* Placental-like alkaline phosphatase. **Cancer**, v.58, p.1689-1694, 1986.

MUILERMAN, H. G.; TER HART, H. G. J.; VAN DIJK, W. Specific detection of inactive enzyme protein after polyacrylamide gel electrophoresis by a new enzyme-immunoassay method using unspecific antiserum and partially purified active enzyme: application to rat liver phosphodiesterase I. **Anal Biochem**, v.120, n.1, p.46-51, 1982.

NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. **Mutat Res**, v.290, p.43-51, 1993.

NAKAJIN, S.; SHIVELY, J. E.; YUAN, P. *et al.* Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein. **Biochem**, v.20, p. 4037-4042, 1981.

NAKAYAMA, T., YOSHIDA, M., KITAMURA, M. L-leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosis. **Clin Chem Acta**, v.30, p.546-548, 1970.

NATHANSON, L.; FISHMAN, W. H. New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. **Cancer**, v.27, p.1388-1397, 1971.

NAWROCKI, J. F.; KIRSTEIN, E. S.; FISHER, R. I. Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. **J Immunol**, v.141, p.672-680, 1988.

NELSON, A. A.; WOODARD, G. Severe adrenal cortical atrophy (Cytotoxic) and hepatic damage produced in fogs by feeding 2,2-Bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). **Arch Pathol**, v.48, p.387-393, 1949.

NEUWALD, P. D.; BROOKS, M. Altered form of placental alkaline phosphatase produced by JAR choriocarcinoma cells in culture. **Cancer Res**, v.41, p.1682-1689, 1981.

NEVILLE, D. M. Jr. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. **J Biol Chem**, v.246, n.20, p.6328-6334, 1971.

NICHOLS, J.; HENNIGAR, G. R. Studies of DDD, 2,2-Bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane. **Exptl Med Surg**, v. 15, p.310-315, 1957.

NODA, M; YOON, K.; RODAN, G. A. *et al* High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. **J Cell Biol**, v.105, n.4, p.1671-1677, 1987.

NORGAARD-PEDERSEN, B. S., ARENDS, H. P., BRINCHER, J. *et al*. Tumour markers in testicular germ cell tumours. Five-year experience from the DATECA Study 1976-80. **Acta Radiol Oncol**, v.23, p.287-294, 1984.

NOURI, A. M. E., TORABI-POUR, N., DABARE, A. A. N. P. M. A new highly specific monoclonal antibody against placental alkaline phosphatase: a potential marker for the early detection of testis tumour. **BJU International**, v.86, p.894-900, 2000.

NOZAWA, S., OHTA, H., ARAI, H. *et al*. Heat-stable alkaline phosphatase in normal uterus and deviation of isoenzyme profile during uterine carcinogenesis. In: STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H., Eds. **Human alkaline phosphatases**, New York: Alan R. Liss Inc., p.223-234, 1984.

OLIVER, R. T. D. Germ cell cancer of the testis. **Curr Opin Oncol**, v.10, p.266-272, 1998.

OLMSTED, J. B. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. **J Biol Chem**, v.256, n.23, p.11955-11957, 1981.

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis I: background and theory. **Ann N Y Acad Sci**, v.121, p.321-349, 1964.

OTTO, V. I.; FRIED, R.; WIEDERKEHR, F. *et al.* Separation of the two most closely related isoenzymes of alkaline phosphatase by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.16, n.7, p.1284-1288, 1995.

PALLESEN, G.; HAMILTON-DUTOI, S. J. K. Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. **Am J Pathol**, v.133, p.446-450, 1988.

PERTSCHUK, L. P.; FELDMAN, J. G.; EISENBERG, K. B. *et al.* Immunocytochemical detection of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, disease-free survival, and clinical endocrine response **Cancer**, v.62, p.342-349, 1988.

PICADO-LEONARD; MILLER, W. L. Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17-hydroxylase/17,20-lyase): similarity with the gene for P450c21. **DNA**, v.6, p.439-448, 1987.

POLLET, D. E., HENDRIX, P. G., NOUVEN, E. J. *et al.* Enzyme-antigen immunoassay for human placental alkaline phosphatase in serum and tissue extracts as tumor marker. **Clin Chem**, v.31, p.41-45, 1985.

PURVIS, J. L.; CANICK, J. A.; MASON, J. I. *et al.* Lifetime of adrenal cytochrome P-450 as influenced by ACTH. **Ann N Y Acad Sci**, v.212, p. 319–343, 1973.

RATHNAM, P.; SAXENA, B. B. Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands. **J Biol Chem**, v.246, p.7087-7094, 1971.

RAYMOND, S.; WEINTRAUB, L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. **Science**, v.130, p.711, 1959.

REDMAN, C. A.; THOMAS-OATES, J. E.; OGATA, S. *et al.* Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.302, pt.3, p.861-865, 1994.

REINCKE, M., KARL, M., TRAVIS, W. H. *et al.*, P53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.78, p.790-794, 1994.

REINHART, M. P.; MALAMUD, D. Protein transfer from isoelectric focusing Gels: the native blot. **Anal Biochem**, v.123, n. 2, p.229-235, 1982.

REISER, J.; WARDALE, J. Immunological detection of specific proteins in total cell extracts by fractionation in gels and transfer to diazophenylthioether paper. **Eur J Biochem**, v.114, n.3, p.569-575, 1981.

RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.76, n.7, p.3116-3120, 1979.

RIBEIRO R. C.; FIGUEIREDO B. C. Childhood adrenocortical tumors. **Eur J Cancer**, no prelo.

RIBEIRO, C. R.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B. C. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n.16, p. 9330-9335, 2001.

ROBSON, E. B.; HARRIS, H. Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. **Ann Hum Genet**, v.30, n.3, p.219-232, 1967.

ROBSON, E. B.; HARRIS, H. Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta. **Nature**, v.207, n.3, p.1257-1259, 1965.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. The HER2/neu oncoprotein in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. **Oncologist**, v.3, p.237-252, 1998.

SAKYIAMA, T.; ROBINSIN, J. C.; CHOU, J. Y. Characterization of alkaline phosphatases from human first trimester placentas. **J Biol Chem**, v.254, n.3, p.935-938, 1979.

SANDRINI R.; RIBEIRO R.C.; LACERDA L de. Childhood adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 82, p.2027-2031, 1997.

SCHALTMAN, K.; PONGS, O. A simple procedure for blotting of proteins to study antibody specificity and antigen structure. **Hoppe-Seylers Z Physiol Chem**, v.361, n.2, p.207-210, 1980.

SCHROEDER, R.; LONDON, E.; BROWN, D. A. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.25, p.12130-12134, 1994.

SCHWAB, U.; STEIN, H.; GERDES, J. *et al.* Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. **Nature**, v.299, p.65-67, 1982.

SCHWARTZ, J. H., LIPMANN, F. Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of *E. coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.47, p.1996-2005, 1961.

SHE, Q., MUKHERJEE, J. J., HUANG, J. *et al.* Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. **FEBS Lett**, v.469, n.2-3, p.163-167, 2000.

SHERWOOD, L. M. **Trans Fifth Rochester Trophoblast Conf**, v.5, p.230-251, 1969.

SHIH, I. M.; WANG, T. L.; TRAVERSO, G. *et al.* Top-down morphogenesis of colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, p.2640-2645, 2001.

SHINODA, J.; YAMADA, H.; SAKAI, N. *et al.* Placental alkaline phosphatase as a tumour marker for primary intracranial germinoma. **J Neurosurg**, v.68, p.710-720, 1988.

SHINODA, J.; YOSHIKI, M.; NOBORU, S. *et al.* Immunohistochemical study of placental alkaline phosphatase in primary intracranial germ-cell tumors. **J Neurosurg**, v.63, p.733-739, 1985.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v.387, n.6633, p.569-572, 1997.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A. *et al.* Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v.244, p.4905707-4905712, 1989.

SLEIN, M. W.; LOGAN, G. F. Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. **J Bacteriol**, v.85, p.369-381, 1963.

SMITH, C. A.; GRÜSS, H. J.; DAVIS, T. *et al.* CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology **Blood**, v.83, p.2045-2056, 1993.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem J**, v.61, n.4, p.629-641, 1955.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis **J Mol Biol**, v.98, n.3, p.503-517, 1975.

STEFANER, I., STEFANESCU, A., HUNZIKER, W. *et al.* Expression of placental alkaline phosphatase does not correlate with IgG binding, internalization and transcytosis. **Biochem J**, v.327, p.585-592, 1997.

STEIN, H.; MASON, D. Y.; GERDES, J. *et al.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue. Evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. **Blood**, v.66, p.848-858, 1985.

STELLWAG, E. J.; DAHBERG, A. E. Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzyloxymethyl (DBM) - paper. **Nucleic Acids Res**, v.8, n.2, p.299-317, 1980.

STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H. Eds. **Human alkaline phosphatases**, New York: Alan R. Liss, 1984(a).

STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H. Eds. **Prog Clin Biol Res**, (Liss, New York) p.166, 1984(b).

STIGBRAND, T., MILLÁN, J., FISHMAN, W. H. The genetic basis of alkaline phosphatase isoenzyme expression. In: Rattazzi, M., Scandalios, J., Whitt, G. Eds.

Izoenzymes: current topics in biological and medical research, v.6, p.93-117. New York: Academic Press, 1983.

STRASSER, A.; HUANG, D. C.; VAUX, D. L. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. **Biochim Biophys Acta**, v.1333, n.2, 1997

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J Mol Biol**, v.79, np.237-248, 1973.

SUMMERS, D. F.; MAIZEL, J. V. Jr.; DARNELL, J. E. Jr. Evidence for virus-specific noncapsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.54, n.2, p.505-513, 1965.

SUSSMAN, H. H.; BOWMAN, M.; LEWIS, J. L. Placental alkaline phosphatase in maternal sera during normal and abnormal pregnancy. **Nature**, v.218, p.359-360, 1968.

SUSTER, S.; MORAN, C. A.; DOMINGUEZ-MALAGON, H. *et al.* Germ cell tumors of the mediastinum and testis: a comparative immunohistochemical study of 120 cases. **Hum Pathol**, v.29, n.7, p.737-742, 1998.

SWALLOW, D. M.; POVEY, S.; PARKAR, M. *et al.* Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isozyme of alkaline phosphatase to chromosome 1. **Ann Human Genet**, v.50, p.229-235, 1986.

SWARTA P.; LOMBARDA, N.; SWART, A. C. Ovine steroid 17-hydroxylase cytochrome P450: characteristics of the hydroxylase and lyase activities of the adrenal cortex enzyme. **Arch Biochem Biophys**, v. 409, n.1, p.145-152, 2003.

SWCHARTING R.; STEIN, H. Cluster report: CD30, in Leukocyte typing IV (KNAPP, W.; DORKEN, B.; GILKS, W. R. *et al.*, eds.) Oxford University, Oxford , UK, February 21-25, p.419, 1989.

SYMINGTON, J.; GREEN, M.; BRACKMANN, K. Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: analysis of adenovirus encoded proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.78, n.1, p177-181, 1981.

SYMPOSIUM ON ESTROGEN RECEPTOR DETERMINATION WITH MONOCLONAL ANTIBODIES, 1984, Monte Carlo, **Cancer Res.**, v.46, supl 8, p.4233s-4313s.

TAZZARI, P. L.; BOLOGNESI, A.; DE TOTERO, D. *et al.* Ber-H2 (anti-CD30)-saporin immunotoxin: a new tool for the treatment of Hodgkin's disease and CD30+ lymphoma. *In vitro* evaluation. **Br J Haematol**, v.81, p.203-211, 1992.

TELFER, C., GREEN, C. D. Induction of germ cell alkaline phosphatase by butyrate and cyclic AMP in BeWo choriocarcinoma cells. **Biochem J**, v.296, p.59-65, 1993(a).

TELFER, J. F., GREEN, C. D. Placental alkaline phosphatase activity is inversely related to cell growth rate in HeLaS3 cervical cancer cells. **FEBS Lett**, v.329, n.3, p.238-244, 1993(b).

TOKUMITSU, S. I.; TOKUMITSU, K.; FISHMAN, W. H. Immunocytochemical demonstration of intracytoplasmic alkaline phosphatase in HeLa TCRC-1 cells. **J Histochem Cytochem**, v.29, n.9, p.1080-1087, 1981.

TONIK, S. E., ORTMAYER, A. E., SCHINDELMAN, J. E. *et al.* Elevation of serum placental alkaline phosphatase in cigarette smokers. **Int J Cancer**, v.31, p.51-53, 1983.

TOWBIN, H.; RAMJOUE, H-P.; KUSTER, H. *et al.* Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. **J Biol Chem**, v.257, n.21, p.12709-12715, 1982.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TSUCHIDA, Y., ENDO, Y., URANO, Y., ISHIDA, M. Alpha-fetoproteins in yolk sac tumors. **Ann N Y Acad Sci**, v.259, p.221-233, 1975.

VAN DE VIJVER, M. J.; PETERSE, J. L.; MOOI, W. J. *et al.* Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. **N Engl J Med**, v.319, p.1239-1245, 1988.

VAN SLEGTENHORST, M.; DE HOOGT, R.; HERMANS, C. *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. **Science**, v.277, p.805-808, 1997.

VENGEROV, YU YU, GUDIMA, S. O., VORONOV, A. V. *et al.* Immunochemical studies of human placental alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues. **Adv Enzyme Reg**, v.27, p.345-354, 1988 .

WATANABE, T., WADA, N., KIM, E. E. *et al.* Mutation of a single amino acid converts germ cell alkaline phosphatase to placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, v.266, n.31, p.21174-21178, 1991.

WEINSTEIN, R. S.; KUSZAK, J. R.; KLUSKENS, L. F. *et al.* P-glycoproteins in pathology: the multidrug resistance gene family in humans. **Hum Pathol**, v.21, p.34-48, 1990.

WILLIAMS, G. H., MCLAUGHKIN, P. J., JOHNSON, P. M. Tissue origin of serum placental-like alkaline phosphatase in cigarette smokers. **Clin Chim Acta**, v.155, p.329-333, 1986.

WINTER, J. S. D. Clinical, biochemical and molecular aspects of 17-hydroxylase deficiency. **Endocrine Res**, v.17, p.53-62, 1991.

WOLKERSDORFER, G. W.; BORNSTEIN, S. R. Tissue remodelling in the adrenal gland. **Biochem Pharmacol**, v.56, p.163-171, 1998.

YANASE, T.; KAGIMOTO, M.; MATSUI, N. *et al.* Combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency due to a stop codon in the N-terminal region of 17-hydroxylase cytochrome P450. **Molec Cell Endocr**, v.59, p.249-253, 1988.

YANASE, T.; KAGIMOTO, M.; SUZUKI, S. *et al.* Deletion of a phenylalanine in the N-terminal region of human cytochrome P45017 results in partial combined 17-hydroxylase/17,20 lyase deficiency. **J Biol Chem**, v.264, p.18076-18082, 1989.

YANASE, T.; SANDERS, D.; SHIBATA, A. *et al.* Combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency due to a 7-basepair duplication in the N-terminal region of the cytochrome P45017 (CPY17) gene. **J Clin Endocr Metab**, v.70, p.1325-1329, 1990.

YANO, T.; LINEHAN, M.; ANGLARD, P.; LERMAN, M. I.; DANIEL, L. N.; STEIN, C. A.; ROBERTSON, C. N.; LAROCCA, R.; ZBAR, B. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v.81, p.518-523, 1989.

YUSUFI, A. N. K., LOW, M. G., TURNER, S. T. *et al.* Selective removal of alkaline phosphatase from renal brush-border membrane and sodium-dependent brush-border membrane transport. **J Biol Chem**, v.258, n.9, p.5695-5701, 1983.

ZAHM, S. H.; WARD, M. H. Pesticides and childhood cancer. **Environ Health Perspect**, v.106, n.3, p.893-908, 1998.

ZHOU, F. X.; MERIANOS, H. J.; BRUNGER, A. T. *et al.* Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.98, p.2250-2255, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1-	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	85
ANEXO 2-	CARTA DE APROVAÇÃO DAS EMENDAS AO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	87
ANEXO 3-	TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO	89

ANEXO 1

ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	86
---	----

Curitiba, 30 de setembro de 2.002.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Giovanna Assis Pereira
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE TUMOR ADRENOCORTICAL INFANTIL EM CULTURAS PRIMÁRIAS", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 24 de setembro de 2.002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.
Protocolo CEP-HC Nº 545.125/2002-09

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 2

ANEXO 2-	CARTA DE APROVAÇÃO DAS EMENDAS AO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	88
----------	--	----

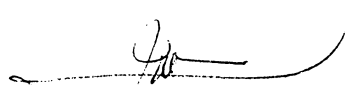
Curitiba, 09 de dezembro de 2003.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Giovanna Assis Pereira
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que a **Emenda**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado “**CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE TUMOR ADRENOCORTICAL INFANTIL EM CULTURAS PRIMÁRIAS**”, foi analisada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de novembro de 2003, e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.
Protocolo CEP/HC 545.125/2002-09

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO 3

ANEXO 3- TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO	90
---	----

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

“CARACTERIZAÇÃO CELULAR DE TUMOR ADRENOCORTICAL DE CRIANÇAS EM CULTURA PRIMÁRIA E ANÁLISE DE UM MARCADOR EMBRIONÁRIO”.

Sua criança tem ou teve um tumor de córtex adrenal. Este é um tumor de uma glândula que se localiza acima do rim. Este tumor é muito raro na maior parte do mundo, mas é encontrado com grande frequência no sul do Brasil. O grupo de pesquisadores do Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) de Curitiba, Paraná, sob a coordenação do Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo desejam verificar se, a mutação que ocorre e, é causa de quase 100% dos tumores de córtex adrenal de crianças do Paraná e São Paulo, também acontece na sua criança. A partir das amostras de tecido do tumor nós queremos coletar informações sobre estes tumores raros. Serão feitas, pela equipe do CEGEMPAC, análises do comportamento das células tumorais em cultura e identificação de um marcador embrionário. Estas análises podem nos ajudar a entender melhor esta doença. Os resultados obtidos podem nos ajudar a desenvolver um tratamento mais eficaz para crianças com tumor adrenocortical.

Você está sendo solicitado a permitir que sua criança participe desta pesquisa. Este termo de consentimento lhe dá informação sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender este estudo e concordar em participar dele, você será solicitado a assinar este termo de consentimento e receberá uma cópia.

Antes de compreender este estudo, é importante que você saiba o seguinte:

- Fica inteiramente a seu critério decidir se sua criança participa ou não deste estudo.
- Caso você decida não permitir que sua criança participe deste estudo, ou que venha mais tarde a desistir de continuar neste estudo sua criança não perderá os benefícios do tratamento médico que recebe do CEGEMPAC.

Por que este estudo está sendo realizado?

Nós estamos tentando entender mais sobre esta doença. O objetivo deste estudo é utilizar uma parte do tumor descartado da cirurgia a ser realizada (ou que já foi realizada) para caracterizar o comportamento das células tumorais *in vitro*, como crescimento e padrão hormonal.

Quantos pacientes participarão deste estudo?

Não há limite para o número de pacientes que podem participar. Nós esperamos ter de 15 a 20 pacientes por ano.

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 2 de 7

Pacientes < 15 anos de idade

O que está envolvido neste estudo?

O pediatra de seu filho ou filha nos fornecerá informações clínicas, as quais serão encaminhadas juntamente com a amostra do tumor para Curitiba. As informações irão sem o nome da sua criança. No lugar do nome irá apenas um código que identificará sua criança. Apenas o médico da sua criança e o investigador principal em Curitiba (Dr. Bonald C. Figueiredo) saberão como interpretar o código.

Quanto tempo permanecerá a criança neste estudo?

Não haverá limite de tempo para este estudo. A identidade da criança e o lugar onde ela está sendo tratada não serão revelados. Depois de concluídas as análises você será avisado sobre as conclusões da pesquisa e o que sobrou do tumor voltará para o investigador principal em Curitiba (Dr. Bonald C. Figueiredo). Ele permanecerá com o tumor até que seja necessário repetir a mesma pesquisa ou fazer outro estudo, se você assim permitir mediante novo termo de consentimento.

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Você poderá desistir de permitir que sua criança continue neste estudo a qualquer momento. Caso desista, a pedido seu, nós retiraremos as amostras de tumor desta pesquisa. Independentemente de qual seja a sua escolha, os melhores cuidados disponíveis no serviço serão oferecidos para sua criança.

Quais os riscos deste estudo?

Nós coletaremos informações padrões sobre cuidados para sua criança. Diante da simplicidade do que é coletado para pesquisa (uma amostra de tumor descartada da cirurgia) e das informações clínicas que ficarão sob sigilo, é muito pouco provável haver riscos durante a participação da sua criança neste estudo. O maior risco é a possibilidade de que as informações sobre as amostras de tecido tumoral guardadas poderão, acidentalmente, estar com o nome da criança ao invés de seu código. Para evitar que isto aconteça, faremos várias revisões dos dados a fim de excluir o nome da sua criança, ou qualquer outra informação que a identifique. Portanto, é importante que você saiba que:

1. As amostras de tumor serão armazenadas com um código sem revelar o nome da criança.
2. Você e sua criança podem se recusar a participar deste estudo. Sua criança pode se retirar deste estudo quando você assim desejar, e se isto acontecer, interromperemos as análises nas amostras do tumor da sua criança.

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 3 de 7

Pacientes < 15 anos de idade

Quais são os benefícios deste estudo?

Sua criança poderá não receber qualquer benefício deste estudo. Entretanto, as informações obtidas a partir deste estudo poderão propiciar aos pesquisadores maiores conhecimentos sobre as causas deste tipo de câncer, bem como entender as melhores maneiras de se tratá-lo.

Que outras opções existem?

Você poderá escolher não participar deste estudo. Sua criança poderá sair do mesmo em qualquer momento. Mesmo que ela saia, terá a mesma cobertura nos cuidados médicos que, normalmente, teria fora deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

O médico da sua criança será informado sobre qualquer informação nova obtida durante o curso desta pesquisa. Você também tem o direito de saber sobre os resultados deste estudo e será notificado quando necessário. Poderá receber informações e respostas para suas perguntas em qualquer fase deste trabalho ou mesmo da conclusão. Se desejar saber mais sobre quando e como obter os resultados desta pesquisa você poderá contatar Dr. Bonald C. Figueiredo pelo tel., 41-30293204 ou 41-99770719.

O que dizer sobre confidencialidade?

As informações sobre a doença de sua criança serão repassadas ao CEGEMPAC com um código e não com o nome dela. O código será guardado no prontuário da criança e esse ficará no serviço do médico dessa criança. O termo de consentimento esclarecido ficará com o médico da sua criança, uma segunda cópia, com você e uma terceira será mantida no CEGEMPAC.

Os prontuários com todos os dados clínicos das crianças são protegidos de acordo com determinações das leis brasileiras, através do Comitê Nacional de Ética (Brasília). Informações obtidas deste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o nome da sua criança não será incluído.

O que dizer sobre custos e pagamentos?

Não haverá custos para sua criança participar deste estudo. Nem você ou o médico da sua criança serão pagos para fornecer amostras de tumor para este estudo.

O que dizer sobre compensação por doença ou injúria?

Nenhum tipo de tratamento será envolvido neste estudo. Portanto, é muito pouco provável que sua criança esteja correndo qualquer forma de risco como ficar doente ou ser lesado como

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 4 de 7

Pacientes < 15 anos de idade
resultado deste estudo. Mesmo sendo bastante remota a possibilidade de ocorrer algum tipo de prejuízo moral ou financeiro, ou algum dano físico ou que comprometa a saúde de seu filho, entendemos que você poderá apresentar sua queixa ou qualquer pergunta sobre esta pesquisa ao Dr. Bonald C. Figueiredo em Curitiba, PR (tel 41-30293204 ou 41-99770719). Se você tiver qualquer dúvida sobre os direitos da sua criança, você como indivíduo que participa da pesquisa, poderá entrar em contato com o responsável pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas do Paraná (tel.41-360-1896).

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 5 de 7

Pacientes < 15 anos de idade

DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade que minha criança tome parte neste estudo.
2. Tive a oportunidade de conversar tanto quanto eu quis com o médico Dr. _____, que está cuidando da minha criança, sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos.
3. Eu fui informado (a) que não haverá custos adicionais para que minha criança participe desta pesquisa. É notório que desde muito tempo no Hospital de Clínicas de Curitiba (ao qual o CEGEMPAC está vinculado) não há gastos financeiros pelos pacientes ou seus familiares por serviços médicos prestados, incluindo qualquer custo pela participação neste estudo. Estes hospitais cobram de outras instituições governamentais ou de companhias de seguro por estes custos.
4. Fui informado(a) que é norma do Hospital de Clínicas de Curitiba, não pagar para qualquer um que participe de estudo como esse, nem por tratamentos recebidos pelos participantes, bem como por produtos ou valores obtidos deste estudo.
5. Fui informado (a) que poderei apresentar queixa que venham a acontecer caso aconteça algo com minha criança por participar deste estudo. Fui informado (a) também que os investigadores do CEGEMPAC tratarão de dar o suporte necessário, caso ocorra qualquer injúria decorrente de algum ato ligado à participação de minha criança nesta pesquisa. Estou ciente de que isso será feito dentro das possibilidades do Hospital de Clínicas de Curitiba, usando suas equipes e sua infra-estrutura. Quando o tratamento estiver fora do alcance destes hospitais, os responsáveis pelo projeto ajudarão a localizar o tratamento adequado em outro lugar.
6. Fui informado que, tanto os dados clínicos da minha criança quanto os resultados sobre as pesquisas nos tumores, não serão disponibilizados para qualquer pessoa fora deste hospital sem minha permissão. Fui informado também que quando surgir outra pesquisa pelo mesmo grupo, eu serei consultado para decidir se permitirei ou não o uso das amostras de tecido do tumor na nova pesquisa.
7. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre qualquer injúria ocorrida por causa da participação de minha criança neste projeto poderei telefonar para Dr. Bonald C. Figueiredo em Curitiba (tel 41-30293204 ou 41-99770719).
8. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba (tel. 41-360-1896).
9. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 6 de 7

Pacientes < 15 anos de idade

DECLARAÇÃO DO PAI/MÃE OU GUARDIÃO PARA ESTUDOS COM AMOSTRAS DE TUMOR

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas. Eu recebi respostas para todas as minhas perguntas. Eu dou permissão para minha criança participar desta pesquisa.

Nome do paciente:

_____ Pai/Mãe	_____ Data	_____ Hora
_____ Guardião	_____ Data	_____ Hora

DECLARAÇÃO DO PACIENTE (COM OU ACIMA DE 14 ANOS DE IDADE)

Meu/minha médico(a) ou pessoa designada por ele/ela me explicou as razões desta pesquisa, do tratamento, dos riscos, e benefícios. Fui incentivado a fazer perguntas. Recebi respostas para todas as minhas perguntas. Eu concordo em participar desta pesquisa.

Nome do paciente: _____

_____ Data	_____ Hora
---------------	---------------

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o(s) pai(s) e com a criança participante. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo quaisquer riscos que possam ocorrer. Ainda declaro que o pai/a mãe ou guardião, bem como o próprio paciente foram incentivados a fazerem perguntas sobre esse estudo.

Médico/Investigador/Designado:

_____ Data	_____ Hora
---------------	---------------

Código do paciente:
Nome do paciente:

Página 7 de 7

Pacientes < 15 anos de idade

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, riscos e benefícios foram apresentados ao paciente/pai(s)/guardião.

Testemunha: _____

Data

Hora

Em caso de perguntas ou emergências com referência a esse protocolo, por favor contatar diretamente: Dr. Bonald C. Figueiredo ou Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba